

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



**DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA
XXIV CICLO**

Indirizzo Entomologia e Zoologia Agraria



TESI DI DOTTORATO

**“Caratterizzazione morfo-bio-molecolare di *Anagrus* Haliday
(Hymenoptera:Mymaridae) parassitoidi di uova di cicaline”**

TUTOR:
PROF. A. P. GARONNA
COTUTOR:
PROF. G. VIGGIANI

COORDINATORE DEL CORSO:
PROF. M. LORITO

CANDIDATO:
DOTT. FRANCESCO NUGNES

Portici, 2011

a Lucia

*«In rebus quibuscumque difficilioribus non expectandum,
ut qui simul, et serat, et metat,
sed praeparatione opus est, ut per gradus maturescant.»*
BACON

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 I Chalcidoidea	pag. 1
1.2 I Mymaridae	pag. 2
1.3 Raggruppamenti sopragenerici dei Mymaridae	pag. 4
1.4 Il genere <i>Anagrus</i> Haliday	pag. 4
1.4.1 Caratteristiche del Genere <i>Anagrus</i> (<i>Anagrus s.str.</i>)	pag. 6
1.4.2 Gruppo <i>atomus</i> Linnaeus	pag. 11
1.4.3 Biologia	pag. 12
1.4.3.1 Riproduzione	pag. 12
1.4.3.2. Ciclo di sviluppo uovo-adulto	pag. 13
1.4.3.3. Tempo di sviluppo uovo-adulto	pag. 15

2. SCOPO DEL LAVORO

pag. 17

3. MATERIALI E METODI

pag. 21

3.1 Allevamenti in piastra	pag. 21
3.2 Prove di accoppiamento	pag. 22
3.3 Studio del Sistema <i>Q. ilex</i> – <i>L. aurovittata</i> – <i>A. ustulatus</i>	pag. 23
3.4 Materiale utilizzato per l'analisi morfo-molecolare	pag. 24
3.5 Analisi Molecolari	pag. 27
3.5.1 Estrazione del DNA genomico	pag. 27
3.5.2 Amplificazione dei geni ribosomali	pag. 28
3.5.3 Amplificazione della subunità mitocondriale COI	pag. 29
3.5.4 Clonaggio e sequenziamento degli ampliconi	pag. 31
3.5.5 Allineamenti	pag. 32
3.5.6 Analisi Filogenetica	pag. 36
3.5.6.1 Scelta del modello di sostituzione nucleotidica	pag. 36
3.5.6.2 Massima Parsimonia	pag. 37
3.5.6.3 Maximum Likelihood	pag. 38
3.5.6.4 Inferenza Bayesiana	pag. 38
3.5.6.5 Stima dei Network di Parsimonia	pag. 39
3.5.6.6 Analisi delle Distanze Genetiche	pag. 40
3.6 Intersimple Sequence Repeat ISSR-PCR DNA fingerprinting	pag. 40
3.7 Studio degli endosimbionti	pag. 43
3.7.1 Individuazione tramite DGGE	pag. 43
3.7.2 Multilocus Sequence Typing System	pag. 46
3.8 Studi morfometrici	pag. 48
3.8.1 Preparazione dei campioni	pag. 48

3.8.2 Analisi morfometrica	pag. 49
4. RISULTATI	pag. 50
4.1 Allevamenti e crossing test	pag. 50
4.2 Studio del Sistema <i>Q. ilex</i> – <i>L. aurovittata</i> – <i>A. ustulatus</i>	pag. 52
4.2.1 Catture trappole	pag. 52
4.2.2 Rilevamento degli stadi preimmaginali di <i>Anagrus</i>	pag. 52
4.3 Analisi Molecolari	pag. 55
4.3.1 Analisi delle Sequenze	pag. 55
4.3.2 Analisi Filogenetica	pag. 56
4.3.3 Network di Parsimonia	pag. 63
4.3.4 Analisi delle Distanze Genetiche	pag. 63
4.3.5 ISSR-PCR DNA Fingerprinting	pag. 66
4.4 Studio degli Endosimbionti	pag. 66
4.4.1 Individuazione tramite DGGE	pag. 66
4.4.2 MLST: Multilocus Sequence Typing System	pag. 67
4.5. Analisi Morfometrica	pag. 69
5. DISCUSSIONI	pag. 73
6. CONCLUSIONI	pag. 80
7. RINGRAZIAMENTI	pag. 81
8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	

1.INTRODUZIONE

1.1 I Chalcidoidea

Gli Hymenoptera rappresentano uno degli ordini d'insetti dominanti sulla terra sia in termini di numero di specie sia in base alla diversità biologica (Austin & Dowton, 2000). Quest'ordine include in maggioranza entomofagi parassitoidi ma non mancano le specie fitofaghe. Alcuni dei più importanti gruppi di imenotteri parassitoidi utilizzati in programmi di lotta biologica appartengono alla superfamiglia Chalcidoidea (Heraty, 2004).

Questa superfamiglia attualmente include 23000 specie descritte e catalogate, divise in 19 famiglie e più di 90 sottofamiglie. Si stima però che le specie esistenti potrebbero raggiungere e superare 500000 unità (Noyes, 2011). Lo studio e la classificazione tradizionale basata sui caratteri morfologici dei calcidoidei sono molto difficoltosi a causa della convergenza dei caratteri e la frequente riduzione o perdita di elementi discriminanti (Heraty, 2004). Alcune specie hanno dimensioni superiori a 45 mm ma la maggior parte di esse hanno dimensioni comprese tra 3 mm e 140 µm. Dopo più di due secoli di lavori descrittivi riguardanti tale superfamiglia, numerosi aspetti tassonomici e biologici sono ancora irrisolti e frequentemente rivisti (Campbell *et al.*, 2000)

Il ruolo dei calcidoidei è ritenuto fondamentale nella regolazione delle popolazioni di artropodi terrestri (Grissell & Schauff, 1997). Essi infatti, attaccano altri artropodi appartenenti a 339 famiglie di ben 15 ordini, includendo tutti gli ordini degli endopterigoti, molti esopterigoti e persino alcuni aracnidi. La loro importanza ecologica ed economica è cresciuta nel corso del XX secolo e, sino ad ora, più di 800 differenti specie sono state impiegate in programmi di controllo biologico (Noyes, 2011).

1.2 I Mymaridae

La famiglia Mymaridae attualmente include 103 generi e 1424 specie di imenotteri diffusi in tutti gli ambienti terrestri (Noyes, 2011).

Gibson (1986) propose che i Mymaridae potessero essere considerati come il *sister group* dei Chalcidoidea sulla base di evidenze morfologiche, ma senza alcuna conferma. I risultati ottenuti da recenti studi filogenetici di Munro *et al.* (2011) hanno corroborato tale ipotesi.

Sebbene siano conosciute specie di dimensioni superiori ai 4 mm di lunghezza, i mimaridi sono generalmente rappresentati da imenotteri di piccole o piccolissime dimensioni, solitamente inferiori a 1.5 mm di lunghezza. (Noyes & Valentine, 1989). A tale famiglia infatti appartiene il più piccolo insetto sinora conosciuto, *Dicopomorpha echmepterygis*, il cui maschio misura appena 139 μm (Mockford, 1997).

Morfologicamente, i generi afferenti alla famiglia dei Mymaridae, possono essere riconosciuti per una particolare scultura ad “H” sul capo (Gibson *et al.*, 1999) formata da una carena trasversale nella zona frontale, posizionata tra gli ocelli anteriori e i toruli antennali, connessa a due carene orbitali (Noyes & Valentine, 1989) (Fig. 1). La distanza tra i toruli risulta quasi sempre maggiore rispetto alla distanza tra i toruli e gli occhi.

Le antenne lunghe e filamentose, sono composte da 8 a 13 segmenti e non presentano anelli. L’antenna femminile presenta una clava ben distinta, non evidenziata in quella del maschio.

Il gastro mostra una notevole variabilità di forma tra i generi potendo presentarsi da peziolato a sessile.

Sia le ali anteriori che posteriori sono generalmente lunghe e relativamente strette e, solitamente, presentano una lunga frangia (Noyes & Valentine, 1989).

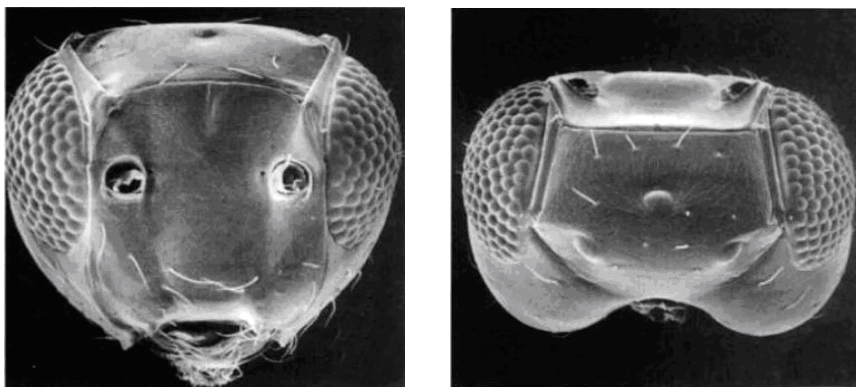


Fig.1. Capo di Mymaridae in cui si evidenzia la caratteristica scultura ad “H” (da Huber, 1997)

L’ala anteriore è considerata peziolata, in quanto nel 99% dei mimaridi la membrana non è estesa alla base dell’ala (Noyes, 2011). La venulazione è solitamente ridotta e si estende nella porzione prossimale. Si possono riconoscere le vene submarginale, marginale e stigmatica (Schauff, 1984).

Per la loro identificazione, oltre i caratteri tradizionali sinora descritti, risulta importante anche l’esame dell’organo copulatore maschile (Viggiani, 1970; Chiappini & Mazzoni, 2000).

Biologicamente tutte le specie afferenti alla famiglia Mymaridae sono endoparassitoidi solitari (raramente gregari) di uova di altri insetti. Sono soliti parassitizzare uova inserite in altri substrati come nel caso di quelle deposte nei tessuti vegetali, o posizionate sotto le cocciniglie o nel suolo (Huber, 1986). Le specie dei mimaridi non sembrano essere particolarmente ospite-specifiche, infatti non è raro che specie appartenenti allo stesso genere possano parassitizzare uova di insetti appartenenti a generi differenti. Gli ospiti più comuni (a cui si riferisce il 45% delle informazioni disponibili in letteratura) sono rappresentati da uova di Homoptera Auchenorrhyncha (Noyes, 2011), ma i mimaridi parassitizzano anche specie afferenti agli ordini degli Hemiptera, Psocoptera, Coleoptera e Diptera.

1.3 Raggruppamenti sopragenerici dei Mymaridae

Nella famiglia Mymaridae si riconoscono vari raggruppamenti sopragenerici. Nella monumentale monografia sui Mymaridae di Debauche (1948) l'autore riconosce la sottofamiglia dei Mymarinae (specie con 4 tarsomeri) e quella dei Gonatocerinae (specie con 5 tarsomeri).

Nella classificazione di Annecke & Doutt (1961) sono invece proposte la sottofamiglia degli Alaptinae (specie con gastro sessile, peziolo con ampia base connessa al mesosoma, mesofragma ampiamente inserito nel gastro) e la sottofamiglia Mymarinae (gastro peziolato o sub peziolato). La sottofamiglia Alaptinae comprende le tribù Alaptini (con 5 tarsomeri) e Anagrini (con 4 tarsomeri); i Mymarinae comprendono le tribù Ooctonini (5 tarsomeri), Mymarini (4 tarsomeri e gastro distintamente peziolato) e Anaphini (4 tarsomeri e gastro sub-peziolato).

Nel 1972 fu proposta un'ulteriore sottofamiglia, gli Eubroncinae, i cui membri presentano una testa cuneiforme (Yoshimoto *et al.*, 1972).

Viggiani (1989) propose una nuova classificazione dei Mymaridae sulla base dell'organo copulatore maschile riconoscendo le sottofamiglie Lymaeoninae (edeago non incapsulato in una fallobase e con apodemi articolati), Mymarinae (con edeago incapsulato e apodemi fusi) e Camptopterinae (edeago non incapsulato e senza apodemi).

Nel 2001 Huber ha proposto una classificazione subgenerica basata su linee evolutive in cui considera primitive le specie di Mymaridae che presentano 5 tarsomeri e funicolo femminile composto da 8 articoli.

La classificazione dei Mymaridae è ancora incerta sotto determinati aspetti e pertanto è in un continuo stato di flusso.

1.4 Il genere *Anagrus* Haliday

Alexander Henry Haliday (1833) istituì il genere *Anagrus* descrivendolo con le seguenti caratteristiche: antenna maschile di 13 articoli, quella

femminile di 9 e caratterizzata da una clava non divisa; tarsi composti da 4 articoli ed addome sessile.

Haliday vi incluse 3 specie: la specie *Anagrus* (= *Ichneumon*) *atomus*, descritta per la prima volta da Linneo nel “Systemae Naturae” del 1767, l’*A. incarnatus* e l’*A. ustulatus*.

Negli anni a seguire molti autori si avvicendarono nella sinonimizzazione o validazione delle specie. Bakkendorf (1925) sinonimizzò tutte le specie descritte sino a quel momento con *A. incarnatus*. Debauche (1948) ha dato la prima descrizione dettagliata di *A. atomus* e ha sinonimizzato *A. ustulatus* con questa specie. L’autore ha anche fornito la descrizione e caratteri distintivi di *A. incarnatus*.

Graham (1982) rivide il materiale della collezione Haliday validando la specie *A. ustulatus*. Egli, inoltre, riconobbe e distinse i gruppi *atomus* ed *incarnatus*, considerando *A. ustulatus* specie sola. Graham basò la distinzione tra i due gruppi sulla forma del terzo segmento funicolare, cilindrico in *atomus*, simile al secondo segmento, mentre in *incarnatus* è di forma differente da quest’ultimo, cioè più ingrossato almeno distalmente.

Chiappini (1989) in una revisione delle specie di *Anagrus* europee discrimina il gruppo *atomus* dall’*incarnatus* in base al solo numero dei sensilli lineari presenti sulla clava, rispettivamente 3 o 5 nonché in base al numero di setole (1 o 2-3) presenti sulle valve esterne dell’ovopositore.

Il valore tassonomico dell’armatura genitale maschile nella discriminazione delle specie di *Anagrus* è stato messo in evidenza da Viggiani (1970). Tali caratteri morfologici non sono attualmente considerati nella discriminazione dei gruppi *atomus* ed *incarnatus*.

1.4.1. Caratteristiche del Genere *Anagrus* (*Anagrus s.str.*)

Le specie afferenti al genere *Anagrus* (Fig. 2) hanno gastro tronco alla base e sessile ed inoltre presentano 4 tarsomeri, quindi possono essere inclusi nella sottofamiglia degli Alaptinae tribù Anagrini.

Il corpo si presenta sottile e slanciato e di dimensioni comprese tra 0.2 e 1.2 mm, di colorazione generalmente chiara, variante dal giallo molto pallido al rosso-bruno.

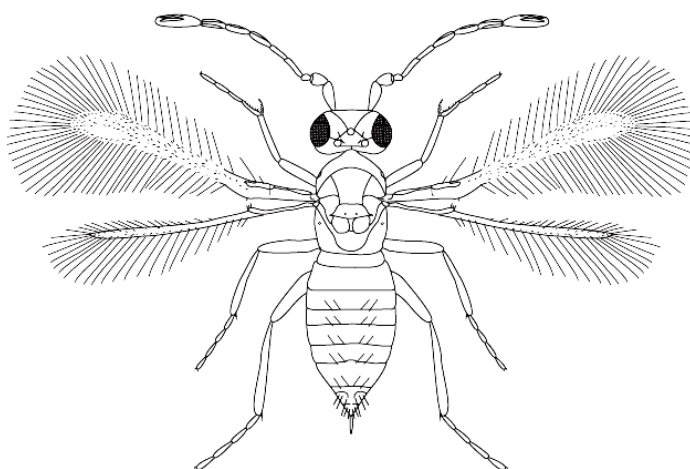


Fig. 2. Disegno schematico di un individuo femminile di *Anagrus* sp.
(da Chiappini & Huber, 2008)

FEMMINA

Le antenne della femmina (Fig. 3) sono costituite da 9 articoli, dei quali 6 al funicolo, la clava è intera. Il rapporto tra gli antennomeri, la loro forma nonché il numero e la distribuzione dei sensilli lineari è variabile in rapporto alle diverse entità specifiche.

Il torace è stretto e allungato, con pronoto molto sviluppato anche lateralmente. Il mesonoto si presenta ben sviluppato con scutello di forma trapezoidale e diviso longitudinalmente. Il postscutello è lungo quanto lo scutello e leggermente arrotondato nella parte distale. Il metanoto è corto ed un po' più largo del postscutello.

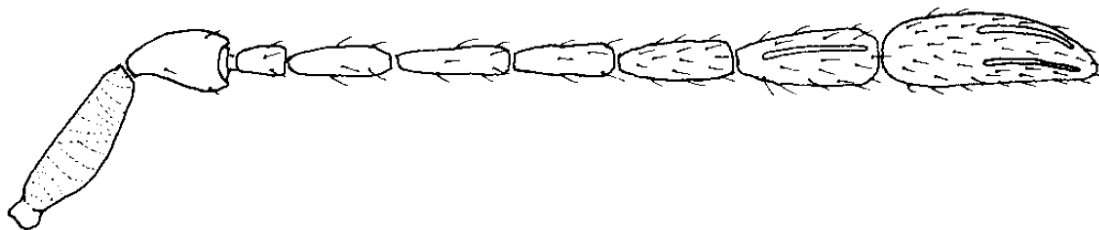


Fig. 3. Antenna femminile di *Anagrus* sp.

Le ali anteriori (Fig. 4) solitamente sono molto strette e presentano una lunga frangia marginale. La venulazione è limitata al terzo basale e rappresentata da una vena submarginale lunga il doppio della marginale che forma una sorta di sigmoide con la molto breve vena stigmatica. Le ali posteriori sono più strette e leggermente più corte delle ali anteriori, con frangia marginale lunga e setole discali sistemate in una o due file. L'ovopositore è variamente sviluppato.

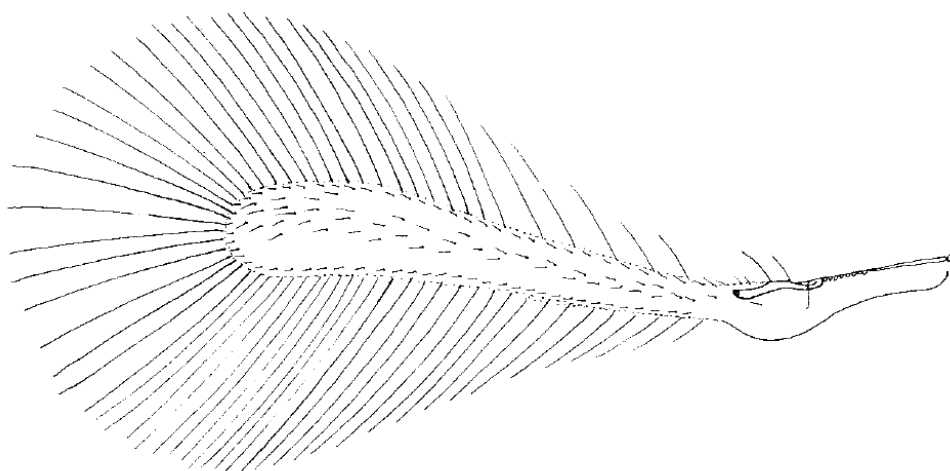


Fig. 4. Ala anteriore di *Anagrus* sp.

MASCHIO

Le antenne maschili sono filiformi e formate da 13 articoli, con clava non differenziata, nel flagello sono presenti segmenti cilindrici ognuno dei quali è provvisto di 4-5 sensilli lineari.

Il corpo e le ali del maschio non riscontrano differenze significative con quello della femmina.

L'organo copulatore maschile presenta una fallobase con ampia apertura antero-dorsale, lamine paramerali ridotte e diti volsellari a cono o uncinati. L'edeago è tubulare, ricurvo verso il basso e con apodemi di varia lunghezza.

Dagli anni '70, a seguito delle forti infestazioni di cicaline su vite in Nord America e in Europa è emerso l'interesse per un approfondimento delle conoscenze relative alle specie di *Anagrus*, alcune delle quali prese in considerazione come potenziali organismi di lotta biologica. Sono state quindi revisionate numerose specie a livello mondiale e fornite alcune chiavi dicotomiche per la loro identificazione (Sahad & Hirashima, 1984; Chiappini *et al.*, 1996; Triapitsyn, 2002).

Attualmente, le specie di *Anagrus* considerate valide, escluse le sottospecie, risultano 78 (Universal Chalcidoidea Database, Noyes 2011) e sono riportate in tabella 1.

Tab. 1. Specie valide di *Anagrus* secondo il National Universal Chalcidoidea Database.

Specie	Autore(i)	Distribuzione
<i>A. aegyptiacus</i>	Soyka, 1950	Paleartica
<i>A. ainu</i>	Triapitsyn & Berezovskiy, 2004	Paleartica
<i>A. amazonensis</i>	Triapitsyn, Querino & Feitosa, 2008	Neotropicale
<i>A. antipodus</i>	Triapitsyn, 2001	Australasia
<i>A. armatus</i>	(Ashmead, 1887)	Nearctica, Neotropica, Orientale, Australasia
<i>A. atomus</i>	(Linnaeus, 1767)	Paleartica, Nearctica, Neotropicale, Australasia
<i>A. avalae</i>	Soyka, 1956	Paleartica, Nearctica, Neotropicale, Australasia
<i>A. baeri</i>	Girault, 1912	Australasia
<i>A. bakkendorfi</i>	Soyka, 1946	Paleartica
<i>A. brasiliensis</i>	Triapitsyn, 1997	Neotropicale
<i>A. breviclavatus</i>	Jesu & Viggiani, 2007	Afrotropicale
<i>A. brevifuniculatus</i>	Viggiani & Jesu, 1995	Afrotropicale
<i>A. breviphragma</i>	Soyka, 1956	Paleartica, Neotropicale
<i>A. brocheri</i>	Schulz, 1910	Paleartica
<i>A. capensis</i>	Hedqvist, 1960	Afrotropicale
<i>A. columbi</i>	Perkins, 1905	Orientale (Hawaii)
<i>A. daanei</i>	Triapitsyn, 1998	Nearctica
<i>A. dalhousieanus</i>	Mani & Saraswat, 1973	Orientale
<i>A. delicatus</i>	Dozier, 1936	Nearctica
<i>A. dilatatus</i>	Soyka, 1956	Paleartica
<i>A. elegans</i>	Chiappini, 2002	Orientale
<i>A. elongatus</i>	(Risbec, 1950)	Afrotropicale
<i>A. empanadus</i>	Triapitsyn, 2011	Neotropicale
<i>A. empoascae</i>	Dozier, 1932	Nearctica, Orientale, Neotropicale
<i>A. ensifer</i>	Debauche, 1948	Paleartica
<i>A. epos</i>	Girault, 1911	Nearctica
<i>A. erythroneuræ</i>	S. Trjapitzin & Chiappini, 1994	Nearctica
<i>A. fennicus</i>	Soyka, 1956	Paleartica
<i>A. fisheri</i>	Donev, 1998	Paleartica
<i>A. flaveolus</i>	Waterhouse, 1913	Orientale, Nearctica, Neotropicale
<i>A. flaviapex</i>	Chiappini & Lin, 1998	Paleartica, Orientale
<i>A. foersteri</i>	(Ratzeburg, 1848)	Paleartica
<i>A. fragranticus</i>	Triapitsyn, 2003	Paleartica
<i>A. frequens</i>	Perkins, 1905	Paleartica, Afrotropicale, Neotropicale, Australasia
<i>A. funebris</i>	Mathot, 1968	Afrotropicale
<i>A. gonzalezae</i>	Triapitsyn, 1997	Neotropicale
<i>A. humicola</i>	Mathot, 1968	Afrotropicale
<i>A. incarnatus</i>	Haliday, 1833	Paleartica, Nearctica, Australasia, Neotropicale
<i>A. insularis</i>	Dozier, 1936	Hawaii

<i>A. japonicus</i>	Sahad, 1982	Palaearctica, Australasia
<i>A. klop</i>	Triapitsyn, 2001	Australasia
<i>A. kvas</i>	Triapitsyn & Berezovskiy, 2004	Palaearctica
<i>A. lineolus</i>	Triapitsyn, 1999	Neartica, Neotropica
<i>A. longifrangitatus</i>	Jesu & Viggiani, 2007	Afrotropica
<i>A. longitibialis</i>	Donev, 1996	Palaearctica
<i>A. minutus</i>	Chiappini & Lin, 1998	Palaearctica
<i>A. miriamae</i>	Triapitsyn & Virla, 2004	Neotropica
<i>A. nigriceps</i>	(Smits van Burgst, 1914)	Palaearctica, Neartica
<i>A. nigriventris</i>	Girault, 1911	Neartica, Neotropica, Australasia
<i>A. nilaparvatae</i>	Pang & Wang, 1985	Palaearctica, Orientale
<i>A. oahuensis</i>	Triapitsyn & Beardsley, 2000	Neartica
<i>A. obscurus</i>	Förster, 1861	Palaearctica
<i>A. obvius</i>	Soyka, 1956	Palaearctica
<i>A. ogloblini</i>	Triapitsyn, 1999	Neartica
<i>A. paranagrosimilis</i>	Chiappini & Lin, 1998	Palaearctica
<i>A. proscassellatii</i>	Viggiani & Jesu, 1995	Afrotropica
<i>A. prounilinearis</i>	Viggiani & Jesu, 1995	Afrotropica
<i>A. puella</i>	Girault, 1911	Neotropica
<i>A. putnamii</i>	(Packard, 1864)	Neartica
<i>A. raygilli</i>	Triapitsyn, 2000	Neartica, Neotropica
<i>A. scassellatii</i>	Paoli, 1930	Afrotropica
<i>A. sensillatus</i>	Viggiani & Jesu, 1995	Afrotropica
<i>A. setosus</i>	Chiappini & Lin, 1998	Palaearctica
<i>A. similis</i>	Soyka, 1956	Palaearctica
<i>A. sophiae</i>	Triapitsyn, 1995	Neartica
<i>A. spiritus</i>	Girault, 1911	Neartica
<i>A. stethynioides</i>	Triapitsyn, 2002	Neartica, Neotropica
<i>A. striatus</i>	Chiappini & Lin, 1998	Palaearctica
<i>A. subfuscus</i>	Förster, 1847	Palaearctica, Neartica, Neotropica
<i>A. supremosimilis</i>	Soyka, 1956	Palaearctica
<i>A. takeyanus</i>	Gordh, 1977	Palaearctica, Neartica
<i>A. tretiakovae</i>	Triapitsyn, 1998	Neartica
<i>A. urichi</i>	Pickles, 1932	Neotropica
<i>A. ustulatus</i>	Haliday, 1833	Palaearctica, Neotropica, Australasia
<i>A. vilis</i>	Donev, 1989	Palaearctica
<i>A. virginiae</i>	Triapitsyn & Puttler, 2006	Neartica
<i>A. vulneratus</i>	Triapitsyn, 2010	Neartica
<i>A. yawi</i>	Fullaway, 1944	Neartica, Neotropica

1.4.2 Gruppo *atomus* Linnaeus

Le specie appartenenti al gruppo *atomus* sono numerose e distribuite in tutte le ecozone terrestri. In Europa le più diffuse sono *A. atomus* e *A. ustulatus*.

Sulla base delle chiavi dicotomiche per le specie del genere *Anagrus* è possibile distinguere *A. atomus* da *A. ustulatus* (Chiappini, 1989; Chiappini *et al.*, 1996).

A. atomus : ♀ presenza di un sensillo sul quarto articolo del funicolo (Fig. 5). Mesoscuto senza setole. Area glabra presso la parte più ampia dell'ala anteriore; ali con tre file irregolari di ciglia discali presso la metà basale e tre o quattro file anteriori con area glabra. Rapporto ovipositore/protibia pari a circa 2.0.

A. ustulatus: ♀ assenza di un sensillo sul quarto articolo del funicolo. Ciliazione discale presso la parte più ampia dell'ala anteriore in quattro o cinque file. Rapporto ovipositore/protibia pari a 1.8-1.9.

Tuttavia, i caratteri discriminanti tra queste due specie si sono dimostrati non stabili a causa di una elevata variabilità intraspecifica, che si sovrappone così a quella interspecifica, e pertanto non possono considerarsi attualmente validi (Matteucig, 2008).

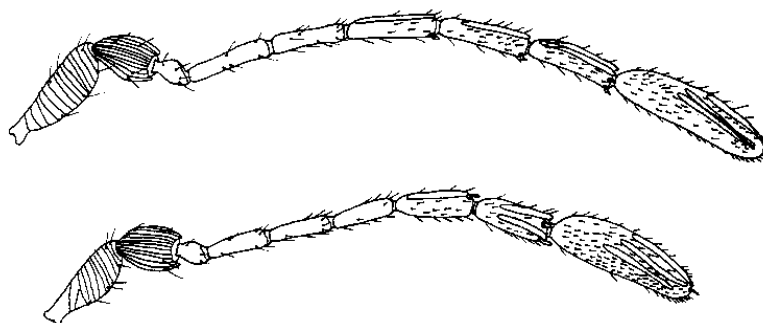


Fig. 5. Antenne femminili di *A. atomus* in alto e *A. ustulatus* in basso (Chiappini, 1987)

1.4.3 Biologia

Le specie afferenti al genere *Anagrus* sono ooparassitoidi di Hemiptera Cicadellidae, Cercopidae, Delphacidae, Miridae e Tingidae, ma raramente anche di Odonata (Dozier, 1936; Santolamazza *et al.*, 2011). Alcune specie rivestono un ruolo rilevante come parassitoidi di fitofagi dannosi a diverse colture economicamente importanti.

1.4.3.1 Riproduzione

La grande maggioranza delle specie di *Anagrus* finora note sono biparentali, con riproduzione aplodiploide in cui la femmina, diploide, si sviluppa da uova fecondate mentre il maschio, aploide, da uova non fecondate.

Poche sono le entità che si riproducono per telitochia. MacGill (1934) indica la presenza di una popolazione di *A. atomus*, parassitoide di *Erythroneura pallidifrons* Edwards, capace di riprodursi per partenogenesi, anche se solitamente tale parassitoide si riproduce per via biparentale. Non è raro dunque che la stessa specie abbia differenti modalità riproduttive. Croning & Strong (1996), infatti, riportano le differenze nelle modalità riproduttive tra alcune popolazioni di *A. delicatus* spazialmente separate. Da tali studi è emerso che in Florida sono diffuse popolazioni arrenotoche, mentre in California sembrano essere diffuse popolazioni telitochiche.

La partenogenesi telitoca è molto comune in alcune superfamiglie, quali quelle dei Chalcidoidea e dei Cynipoidea. Sono conosciute due forme di telitochia negli imenotteri, la prima considerata reversibile ed associata a batteri, l'altra definita non reversibile (Stouthamer & Kazmer, 1994). Nella telitochia associata a batteri, gli endosimbionti possono manipolare la riproduzione dell'ospite in diversi modi, inducendo la partenogenesi, causando la femminizzazione genetica del maschio, comportando il *male-killing* in cui gli embrioni maschili non riescono a svilupparsi ed infine

provocando incompatibilità citoplasmatica tra i gameti (Stouthamer *et al.*, 1993 e 1999a).

I batteri coinvolti nell'induzione alla telitochia sinora studiati sono *Wolbachia*, *Rickettsia*, e *Cardinium*.

Il batterio intracellulare obbligato *Wolbachia* (Classe Alphaproteobacteria dell'ordine Rickettsiales famiglia Anaplasmataceae) è in grado di indurre tutte le forme di manipolazione della riproduzione sinora conosciute (Stouthamer *et al.*, 1999).

E' noto inoltre che diversi ceppi batterici possano essere individuati in un solo insetto e che differenti popolazioni geografiche della stessa specie possano essere infette da ceppi differenti (Werren *et al.*, 1995).

Gli studi filogenetici delle sequenze dei geni 16s rRNA, *ftsZ* e *wsp* (proteina di superficie) di *Wolbachia* hanno portato alla distinzione di 8 supergruppi (A-H). La maggior parte dei supergruppi si rinvencono negli artropodi (A, B, E, F, G e H) e la maggior parte dei ceppi di *Wolbachia* individuati negli insetti appartengono ai supergruppi A e B (Werren *et al.*, 1995).

L'importanza della caratterizzazione dei ceppi di *Wolbachia* risiede principalmente negli effetti che possono causare sul proprio ospite. Alcuni ceppi, infatti, regolando sia la biologia riproduttiva che la fitness dei propri ospiti, potrebbero essere utilizzati in programmi di lotta biologica (Werren, 1997).

Allo stesso tempo, la telitochia in un agente di controllo biologico potrebbe conferire svantaggi quali una bassa variabilità genetica, difficoltà nello studio genetico e quindi limitazioni nel miglioramento genetico stesso (Zchori-Fein *et al.*, 1992).

1.4.3.2.Ciclo di sviluppo uovo-adulto

Dati sperimentali relativi alla durata degli stadi giovanili sono noti per pochissime specie.

In Hesami *et al.* (2004) è descritto lo sviluppo degli stadi preimmaginali di *A. atomus* parassitoide di *Aboridia kermanshah* Dlabola infestanti foglie di *Vitis* sp. alla temperatura di $33 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ed umidità relativa di $33 \pm 3\%$.

Gli stadi preimmaginali di *Anagrus* sono: uovo, larva di I tipo, larva di II tipo e pupa.

Le uova ovariche di *A. atomus* risultano ovoidali allungate e presso un polo portano un peduncolo. Le uova sono trasparenti e il corion presenta una superficie liscia priva di particolari sculture. La lunghezza media è di 102 μm . Le uova deposte mantengono la loro forma originale anche se, all'interno dell'ospite, si verifica un leggero aumento nelle dimensioni facilitato dalla presenza di un corion elastico (Moratorio & Chiappini 1995).

Il primo tipo larvale di *Anagrus* è di forma sacciforme con due estroflessioni presenti sia presso la zona caudale che cefalica. Esse si presentano non segmentate, levigate ed immobili (Moratorio & Chiappini 1995) La lunghezza media della larva di primo tipo è di 203 μm . La zona caudale della larva rimane sempre attaccata al corion, pertanto si ipotizza che la larva assuma nutrimento dall'ospite attraverso la diffusione e l'assorbimento (Sahad, 1984; Moratorio & Chiappini 1995).

Il secondo tipo larvale è definito istriobdellide (Ganin, 1869; Jesu, 2002; Hesami *et al.*, 2004). Rispetto alla larva di primo tipo mostra un corpo più cilindrico e la presenza di costrizioni porta alla formazione di sei segmenti. La testa è conica e carnosa e presenta alcuni processi pelosi ed un paio di mandibole robuste leggermente curve e lunghe circa 39 μm .

Le larve di secondo tipo hanno una durata di 7 giorni, esse si nutrono del tuorlo dell'uovo ospite che è infatti visibile per trasparenza nel loro intestino. Sulla base della morfologia e del comportamento, le larve di secondo tipo mostrano una fase prematura ed una fase matura.

Le larve allo stadio prematuro hanno una lunghezza media di 369 μm , esse sono solite agitare il contenuto delle uova al fine di ottenere il nutrimento. Può infatti accadere che i parassitoidi depongano in uova dove già è presente l'embrione dell'ospite. Questi movimenti, quindi, permettono la distruzione dei tessuti embrionali in formazione (Moratorio & Chiappini, 1995).

La larva di secondo stadio maturo ha una lunghezza media di circa 580 μm , non risulta essere molto attiva e tende ad occupare l'intero spazio all'interno dell'uovo ospite. Da larva prematura a larva matura si nota una crescente intensità nella colorazione arancione dentro il canale alimentare. Infatti esse cominciano ad assumere una colorazione arancione verso il settimo giorno, che diventa arancione scuro- rosso verso il decimo giorno dalla deposizione.

A partire dal decimo giorno dalla deposizione, le larve di secondo tipo entrano nello stadio di prepupa; tale passaggio è indicato dalla cessazione di ogni attività e movimento. Il colore vira verso il rosso e il corpo comincia a segmentarsi in capo, mesasoma e metasoma.

Dopo un giorno circa, si definisce lo stadio pupale che ha una durata di circa sette giorni. Dopo circa tre giorni si cominciano a notare gli occhi composti e gli ocelli, con una colorazione scura, e le appendici. Dal quarto giorno di pupa, le appendici sono ben formate ed è possibile distinguere il sesso osservando la presenza o l'assenza della clava.

Dopo sedici giorni dalla deposizione, l'adulto, completamente formato, inizia la fase di sfarfallamento. Al 17° giorno, l'adulto sfarfalla creando con le mandibole un foro tondeggianti sia nel corion dell'ospite che nel tessuto dell'organo vegetale.

1.4.3.3. Tempo di sviluppo uovo-adulto

La biologia di *A. atomus* è stata descritta anche in Agboka *et al.* (2004) quale parassitoide di *Empoasca decipiens* Paoli infestanti piante di

Vicia fabae. In tale lavoro si riportano le variazioni nel ciclo biologico a diverse temperature (16-20-24-28 \pm 1°C), con umidità relativa di 65-70% (HR) e un fotoperiodo 16:8 (L:D).

Il tempo medio di sviluppo, da uovo ad adulto, è risultato a 16°C pari a 33.6 giorni, a 20°C pari a 22.6 giorni; a 24°C pari a 16.3 giorni e a 28°C pari a 13.3 giorni.

Per completare il suo completo sviluppo, *A. atomus*, necessita 263.2 gradi/giorno e la temperatura minima di sviluppo risulta stimata intorno a 8.39°C.

A 28°C il tasso di sopravvivenza durante tutta la durata dello sviluppo risulta basso rispetto alle altre temperature testate. Anche la *sex ratio* (F/(M+F)) ha analogo andamento, risultando quindi più basso a 28°C (55.9), mentre per le altre tre temperature testate si attesta in media pari a 72.

Le specie del genere *Anagrus* sono solite svernare allo stadio di uovo all'interno delle uova di cicaline (Williams & Martinson, 2000), sebbene sia stata appurata la presenza di adulti durante il periodo invernale su piante sempreverdi dei generi *Quercus* sp. e *Rubus* sp. (Viggiani *et al.*, 2003).

Tuttavia da recenti ricerche è emerso che nel Meridione d'Italia *A. atomus* e *A. ustulatus* sono specie omodiname essendo presenti sia nelle forme preimmaginali che allo stadio di adulto su uova di diverse cicaline e varie essenze vegetali, lungo l'intero arco dell'anno (Matteucig & Viggiani, 2008).

2. SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni si è assistito ad uno sviluppo di tecniche di biologia molecolare applicate alla sistematica, in modo particolare il sequenziamento del DNA, che hanno aumentato l'abilità degli studiosi nel descrivere e definire la diversità biologica (Gebiola, 2008).

E' noto infatti che l'applicazione dei metodi molecolari per la discriminazione specifica di insetti, ha permesso di caratterizzare molte specie di imenotteri laddove studi tassonomici classici, basati solo sull'analisi dei caratteri morfologici, avevano fallito (Kankare *et al.*, 2005).

Sebbene non sempre rappresentino una soluzione definitiva per la caratterizzazione delle entità entomologiche a livello specifico, i dati molecolari, in particolare se integrati con dati di tipo morfologico, biologico ed ecologico, possono spesso risultare decisivi (Bickford *et al.*, 2006).

Inoltre, all'analisi dei geni si tende sempre più spesso ad accostare lo studio degli endosimbionti in quanto possono consolidare uno studio biosistematico. La manipolazione della riproduzione ad opera di batteri endosimbionti infatti, spesso ha risvolti sull'isolamento riproduttivo di una determinata entità, dando così avvio al processo di speciazione (Gebiola, 2008; Adachi-Hagimori *et al.*, 2011). Risulta quindi fondamentale valutare il livello di isolamento riproduttivo tra diverse popolazioni tramite accoppiamenti incrociati, specialmente per i parassitoidi utilizzati come agenti di lotta biologica. Infatti molti parassitoidi utilizzati in programmi di controllo biologico possono essere composti da diverse popolazioni morfologicamente indistinguibili ma riproduttivamente isolate (Croning & Strong, 1996; Triapitsyn, 1998) e, pertanto, l'introduzione di popolazioni di parassitoidi incompatibili tra loro può comportare il completo fallimento di un programma di controllo biologico (Pinto *et al.*, 2003).

Sebbene le specie di *Anagrus* rivestano un ruolo rilevante come limitatori naturali di cicaline e siano praticamente diffuse in tutti gli

ecosistemi, la loro identificazione risulta ancora molto difficoltosa per numerose specie descritte in passato.

L'utilizzo di metodologie e tecniche più avanzate basate sia sull'impiego dei caratteri morfologici che di nuovi marcatori molecolari come elementi discriminanti ha permesso la distinzione delle specie di *Anagrus* afferenti al complesso “*epos*”, ritenute in precedenza specie singola (Triapitsyn, 1998; Triapitsyn *et al.*, 2010).

Interessanti anche gli studi preliminari sull'analisi degli idrocarburi cuticolari effettuati per identificare correttamente le specie del gruppo *atomus* che hanno confermato l'esistenza di differenze fra *A. atomus* e *A. ustulatus*, ma i dati raccolti non consentono ancora di discriminare con certezza i maschi delle due specie (Floreani *et al.*, 2006).

Tuttavia studi sui profili enzimatici elettroforetici non hanno permesso l'individuazione di loci enzimatici per poter discriminare geneticamente le femmine di *A. atomus* e *A. ustulatus*. (Cargnus & Pavan, 2007).

Studi preliminari sulle popolazioni di *Anagrus* gruppo *atomus*, ottenute da diverse cicaline, basati sull'analisi di geni di origine mitocondriale e ribosomale hanno gettato le basi per il loro utilizzo nella discriminazione specifica: tali indagini non hanno confermato la validità diagnostica dei caratteri morfologici tradizionalmente usati per distinguere *A. atomus* e *A. ustulatus* (De León *et al.*, 2008; Monti *et al.*, 2009), evidenziando ancor più l'importanza di un approccio integrato per la ridefinizione della sistematica del gruppo.

La possibilità di mettere in pratica tale approccio su di un interessante sistema biologico, si realizza a seguito di risultati ottenuti nel corso di ricerche sulle specie afferenti al gruppo *atomus* in Italia. Da uova di *Lindbergina aurovittata* (Douglas) (Hemiptera: Cicadellidae) presenti su foglie di *Quercus ilex* nel periodo invernale, è stata ottenuta una specie, che è stata attribuita alla morfospecie *A. ustulatus*, (Viggiani *et al.*, 2003). Sulla base dei dati esclusivamente molecolari, tale popolazione è risultata diversa

rispetto alle altre popolazioni di *A. ustulatus* ottenute da altri ospiti, ma tali differenze non sono state confermate a livello morfologico (Monti *et al.*, 2009).

L. aurovittata in Italia sverna allo stato di uovo in foglie di piante sempreverdi (Vidano *et al.*, 1990). Solitamente la cicalina preferisce specie del genere *Quercus*, (*Q. ilex* e *Q. suber*) ma si ritrova anche su rovo e mirto (Viggiani *et al.*, 2004; Matteucig & Viggiani, 2008). Nel periodo primaverile essa completa una generazione ed i nuovi adulti abbandonano gli ospiti invernali e si spostano su altre piante a foglie caduche afferenti ai generi *Quercus*, *Castanea*, etc. Su questi ultimi ospiti, durante il periodo che va dall'estate al tardo autunno, la cicalina può compiere più generazioni. Gli adulti di *L. aurovittata* dell'ultima generazione estivo-autunnale tornano quindi sugli ospiti invernali, ove procedono alla deposizione delle uova (Vidano *et al.*, 1990)

Le stesse ricerche hanno messo in evidenza che *A. ustulatus* non ha diapausa invernale. Infatti esso sverna sia da adulto che in stadi di varie età nelle uova degli ospiti. Solitamente da metà febbraio a fine marzo si raggiunge il picco degli sfarfallamenti. In Viggiani *et al.* (2003) è stato anche rilevato che la popolazione è rappresentata quasi esclusivamente da femmine.

Ciò premesso, gli obiettivi che tale lavoro di dottorato si è prefisso, sono i seguenti:

- valutare l'isolamento riproduttivo di popolazioni di *Anagrus* del gruppo *atomus*, con caratteristiche morfologiche molto simili, provenienti da diversi ospiti;
- affrontare lo studio della popolazione di *A. ustulatus* in rapporto al sistema *Q. ilex* e *L. aurovittata* mediante un approccio integrato, tramite:

- una serie di monitoraggi e campionamenti volti allo studio della biologia sia del parassitoide che dell'ospite;
- le tecniche tradizionali d'identificazione specifica e l'analisi morfometrica;
- i marcatori molecolari sia d'origine mitocondriale COI (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) che ribosomale 28S-D2 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*)
- lo studio delle relazioni filogenetiche che intercorrono tra le diverse popolazioni di *Anagrus* individuati;
- le tecniche dell'ISSR-PCR fingerprinting (*Intersimple Sequence Repeat - PCR*), per l'identificazione di marcatori specifici;
- la tecnica della DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e il MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) System, per l'individuazione e caratterizzazione di eventuali endosimbionti presenti in *Anagrus* in grado di indurre variazioni nelle modalità riproduttive.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Allevamenti in piastra

Per le prove di accoppiamento incrociato sono stati scelti 2 sistemi: *Eupterix zelleri* (Kirschbaum) allevata su *Mentha* sp. ed *Eupterix decemnotata* Rey, 1891 su *Salvia* sp., che, secondo dati di letteratura, sono ospiti specifici di *A. ustulatus* (I specie), e di *A. atomus* (II specie) (Matteucig & Viggiani, 2008).

Per l'allestimento degli allevamenti sono state prelevate piante di *Mentha* sp. e *Salvia* sp. con foglie che mostravano evidenti sintomi di infestazioni da parte di cicadellidi. In laboratorio da tale materiale, sono stati rilevati e raccolti separatamente gli adulti delle cicaline associate alle piante ospiti.

Sullo stesso materiale, tramite l'utilizzo di uno stereomicroscopio, sono state individuate uova delle cicaline evidentemente parassitizzate da *Anagrus*, che in presenza di larva matura, o pupa del parassitoide, assumono un colore aranciato.

Sezioni circolari di lamina fogliare con uova parassitizzate sono state isolate in microcapsule al fine di permettere il completo sviluppo e lo sfarfallamento degli adulti.

Le microcapsule sono state sistemate in contenitori a chiusura ermetica e mantenuti a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, HR $70\% \pm 5\%$ e fotoperiodo 16:8 L:D.

Ogni giorno si provvedeva alla raccolta di eventuali adulti di *Anagrus* sfarfallati. Tali adulti venivano posti in microeppendorf (200 μl), alimentati con una soluzione di acqua e miele in parti uguali e stoccati in camera climatica ($T 12 \pm 1^\circ\text{C}$) sino al loro utilizzo.

Foglie provenienti da piante non infestate venivano raccolte e posizionate in piastre Petri del diametro di 9cm su di un sottile strato di agar. Su di esse venivano quindi liberati gruppi di adulti di cicaline (15♀ e

5♂) e lasciati liberi di deporre per 24 ore. Trascorso il periodo di deposizione, gli adulti venivano allontanati dalle foglie.

Dopo 3 giorni dalle deposizioni, sulle foglie contenenti uova, venivano liberati adulti di *Anagrus* corrispondenti al sistema scelto e lasciati liberi di deporre per 24 ore. Una volta trascorso il tempo di deposizione i parassitoidi venivano recuperati. Gli *Anagrus* catturati venivano quindi conservati singolarmente in microprovette Eppendorf di 0.5 mL in alcool al 95% e mantenuti sino al loro utilizzo a -20°C.

Le piastre venivano quindi tenute in camera climatica $27 \pm 1^\circ\text{C}$, HR $70\% \pm 5\%$ e 16:8 L:D..

Dopo circa una settimana dalle foglie in piastra venivano ritagliati ed isolati sezioni di lembo fogliare contenenti uova evidentemente parassitizzate al fine di recuperare la progenie ed impiegarle nelle prove di accoppiamento incrociato e le seguenti analisi morfo-molecolari.

3.2 Prove di accoppiamento

La raccolta e l'isolamento di uova parassitizzate sia dai campioni raccolti in campo che dagli allevamenti in piastra hanno permesso l'ottenimento di individui sicuramente vergini. Tali adulti sono stati impiegati in prove di accoppiamento incrociato.

Gli individui sono stati rilasciati a coppie per circa 15 minuti in specifiche arene di osservazione dotate di un piccolo quantitativo di una soluzione composta da acqua e miele in parti uguali per l'alimentazione.

Una volta effettuate le prove, tali individui sono stati recuperati e conservati in alcol etilico assoluto e stoccati a -20°C per le successive analisi morfo-molecolari.

3.3 Studio del Sistema

Quercus ilex – *Lindbergina aurovittata* – *Anagrus ustulatus*.

Dal dicembre 2009 all'aprile 2010 sono state collocate in una lecceta del Parco Gussone sito a Portici, NA (50 m s.l.m.) 3 trappole cromotropiche gialle (13 cm x 24 cm, Glutor), distanti tra loro di circa 300 m, sostituite con cadenza bisettimanale.

In laboratorio, con l'ausilio di uno stereomicroscopio, sono stati contrassegnati e contati tutti gli adulti catturati di *Lindbergina* e di *Anagrus*, distinguendone il sesso.

A cadenza settimanale, nel periodo novembre 2009 all'aprile 2010, sono state raccolte 100 foglie a caso in tre località di detta lecceta. Su tali foglie, in laboratorio, venivano rilevati gli stadi giovanili della cicalina e le uova di *Lindbergina*. Alcune uova parassitizzate, con presenza di larve mature (di colore arancione) o con pupe di *Anagrus* sono state isolate per ottenerne lo sviluppo fino allo sfarfallamento dell'adulto. L'isolamento di tali uova ha previsto il posizionamento del lembo fogliare interessato dalla deposizione, in microcapsule di 15 mm di diametro e 15 mm di altezza. Gli esemplari di *Anagrus* neosfarfallati sono stati posti in alcool etilico assoluto in microprovette Eppendorf di 0.5 mL e conservati a – 20°C sia per effettuare le analisi molecolari che per allestire successivamente i preparati microscopici necessari per la determinazione specifica.

Nel contempo si è svolto un monitoraggio diretto su pianta. Alcune uova di cicalina in cui erano individuabili larve *Anagrus* sono state marcate per rilevare il periodo di sfarfallamento degli adulti. Tali rilevamenti sono continuati saltuariamente per tutto il periodo estivo-autunnale.

Al fine di determinare anche il ciclo biologico di *L. aurovittata*, sono state anche effettuate raccolte di cicaline tramite la battitura di rami.

3.4 Materiale utilizzato per l'analisi morfo-molecolare

Nella tabella 2 sono riportati i campioni raccolti sia dai campionamenti effettuati che dagli allevamenti.

A tali campioni sono stati aggiunti individui provenienti dagli allevamenti della Biofabbrica *BIOWISE* Graffham, Petworth, Sussex Occidentale GU28 0LR, Regno Unito. Gli individui di tale popolazione telitoca afferiscono alla specie *A. atomus* e nel 2003 sono stati oggetto di studi sulle modalità riproduttive di *Anagrus* (Choudhury & Copland, 2003).

L'utilizzo di un outgroup per migliorare l'analisi filogenetica richiede alcune considerazioni:

- l'outgroup deve essere abbastanza collegato al resto delle sequenze, ma ci dovrebbero essere differenze significative tra l'outgroup e gli ingroup al fine di non rendere nulle le differenze tra le sequenze ingroup;

- la scelta di un outgroup troppo diverso dagli ingroup, potrebbe portare ad un'analisi filogenetica scorretta a causa delle eccessive differenze tra le sequenze esaminate (Mount, 2004).

Seguendo tali considerazioni è stato scelto come outgroup un individuo del gruppo *incarnatus* ottenuto da *Castanea* sp..

Codice	Sesso	Ospite	Pianta	Anno	Gruppo	Provenienza	Identificazione iniziale
Q1	♀	L. aurovittata	Q. ilex	2009	QUE	Cattura	A. ustulatus
Q2							
Q3							
Q4							
Q5							
Q6				2010			
Q7							
Q8							
Q9							
Q10							
Q11							
Q12							
Q13							
Q14							
Q21	2011						
Q22							
M01	♀	E. zelleri	Mentha sp.	2010	MEN	Cattura	A. ustulatus
M02							
M03							
M04							
M05							
M06							
M07							
M08							
M09							
M10	♂						
M6-11							
M6-12	♀						
M6-13	♂						
M14	♀						
M15	♀						
M16	♂						
M17							
M18							
M19							
M20							
M21	♀						
M22	♂						
M23							
M6-24	♀						
M25	♂						
M26							
M27							
M28							
M29							
M30	♀						
M6-31							
M32							
M7-01	♂						
M7-02							
M7-03	♀						
M7-04							
M7-05							
M7-06							
M7-07	♂						
M7-08							
M7-09							

Codice	Sesso	Ospite	Pianta	Anno	Gruppo	Provenienza	Identificazione iniziale
M7-10	♂	<i>E. zelleri</i>	<i>Mentha</i> sp.	2010	MEN	Allevamento	<i>A. ustulatus</i>
M7-11	♀						
M7-12							
M7-13	♂						
M7-14							
M7-15	♀						
M7-16							
S1	♀	<i>E. decemnotata</i>	<i>Salvia</i> sp.	2010	SAL	Cattura	<i>A. atomus</i>
S2	♂						
S3	♀						
S4	♂						
S5							
S6	♀						
S7							
S8							
S9							
S11	♂						
S12							
S13	♀						
S14							
S15							
S16							
S17							
S18							
S19							
S20	♂						
S21							
S22						♀	
S23							
S25	♀						
S26							
A.EN10	♀	<i>Hauptidia</i> sp.	<i>Primula vulgaris</i>	2011	A.EN.	Biofabbrica	<i>A. atomus</i> telitoca
A.EN11							
A.EN12							
A.EN13							
AC01	♀	??	<i>Castanea</i> sp.	2011	AC	Cattura	gruppo <i>incarnatus</i>

Tab. 2. Individui di *Anagrus* da campionamenti e allevamenti.

3.5 Analisi Molecolari

Le analisi molecolari sono state effettuate sia presso il laboratorio della sezione di Lotta biologica del Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri” dell’Università Federico II di Napoli (DEZA) sia presso i laboratori del USDA, Beneficial Insects Research Unit, Weslaco, Texas, USA (BIRU).

3.5.1 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico totale è stato estratto da singoli campioni usando 2 differenti metodologie non distruttive:

- Chelex - proteinasi K (modificato da Walsh *et al.*, 1991) che prevede l'utilizzo di 5 µl di proteinasi k e 40 µl di una sospensione di *Chelex 100* al 5% in cui viene immerso il campione. Il composto così ottenuto viene incubato a 55°C per un tempo compreso tra 30 minuti sino a 24 ore. Il tempo di incubazione dipende dall'età e dal metodo di conservazione del campione stesso. Segue quindi un periodo di 8 minuti a 100°C che permette l'inattivazione della proteinasi k. Il supernatante, contenente il DNA totale, è rimosso dopo una centrifugazione a 13000 rpm per 3 minuti, e conservato a -20°C.
- *EDNA HiSpEx tissue kit* (Saturn Biotech, Perth, Australia), seguendo il protocollo di produzione, consistente nell'immersione del campione in una soluzione ottenuta tramite miscelazione di 3 preparati presenti nel kit d'estrazione, a cui segue un periodo di incubazione di 20-30 minuti a 95°C. Al termine, la soluzione ottenuta, contenente il DNA, viene separata dal campione e stoccata a -20°C sino all'utilizzo.

Tali metodi d'estrazione permettono il recupero dei campioni, praticamente intatti, che quindi possono essere preparati e montati per le analisi morfologiche.

Le reazioni di amplificazione del DNA (PCR) sono state effettuate utilizzando i termociclatori BioRad (BioRad Laboratories) nei volumi di reazione indicati nella tabella seguente

Componenti	BIRU	DEZA
H ₂ O dds	15.1 µl	24.4 µl
Buffer PCR 10X *	2 µl	
Buffer 1X (15nM MgCl ₂)		4 µl
dNTPs Mix	0.5 µl	3.2 µl
Primer F/R 10 µM	1 µl	4 µl
Taq polimerasi (5 U/µl)	0.4 µl	0.4 µl
DNA templatato	1 µl	4 µl
Volume totale	20 µl	40 µl

* a differenti concentrazioni di MgCl₂

3.5.2 Amplificazione dei geni ribosomali

I geni ribosomali impiegati nel presente studio sono 28S-D2 e ITS2.

28S-D2 rappresenta il dominio di espansione D2 della subunità 28S ed è stata spesso impiegata per la discriminazione dei generi, ma da studi recenti è risultata utile anche a livello specifico (Campbell *et al.*, 1993; Babcock & Heraty, 2000; Schmidt & Polaszek, 2007; Gebiola *et al.*, 2009).

La porzione ITS2 (*Internal Transcribed Space 2*) rappresenta un'inserzione, trascritta ma non tradotta, tra il dominio 1 e la regione codificante la LSU (*Large subunit*) che comprende il gene 28S. L'ITS2 ha dato ampi risultati sia in studi filogenetici (Campbell *et al.*, 1993; Stouthamer *et al.*, 1999) sia in ricerche volte a discriminare complessi di specie (De León *et al.*, 2004).

Per l'amplificazione di 28S-D2 sono stati utilizzati i primer D2F e D2-CR (Campbell *et al.* 1993, 2000). Le sequenze dei primer e il relativo programma di amplificazione utilizzato sono descritti nella tabella seguente.

Primer	Sequenza 5' - 3'	T (C°)	durata	cicli
D2F	CGT GTT GCT TGA TAG TGC AGC	93	5'	1
		93	45''	34
		48	45''	
D2-CR	TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G	72	45'	1
		72	7	
		4		

Per l'amplificazione del gene ribosomale ITS2 sono stati impiegati 2 set di primer: 5.8S-F con 28S-R (Porter & Collins, 1991) e ITS2-F (Campbell *et al.*, 1993) con ITS2rev-Trich (Stouthamer *et al.*, 1999b), di seguito sono riportate le sequenze e i relativi programmi di amplificazione.

Primer	Sequenza 5' - 3'	T (C°)	durata	cicli
5.8S-F	TGT GAA CTG CAG GAC ACA TGA AC	94	3'	1
		94	30''	45
		45	30''	
28S-R	ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA	72	1'	
		10		
ITS2-F	TGT CAA CTG CAG GAC ACA TG	94	3'	1
		94	45''	45
		55	45''	
ITS2rev-Trich	GTC TTG CCT GCT CTG AG	72	1'	1
		72	7'	
		10		

3.5.3 Amplificazione della subunità mitocondriale COI

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è stato largamente impiegato negli studi tassonomici e per investigare relazioni filogenetiche (Hebert *et al.*, 2003)

Gli animali presentano una molecola circolare di mtDNA formata da circa 15 kb. Come mostrato in figura 6 la molecola è formata da 37 geni che codificano per 22 tRNA, 2rRNA e 13 proteine.

Pur essendo meno abbondante nelle cellule rispetto al DNA ribosomale, tale molecola viene spesso utilizzata nell'analisi delle popolazioni e negli

studi evolutivi di taxa molto correlati in quanto presenta una sequenza relativamente breve ed ha un'ereditarietà materna.



Fig. 6. Rappresentazione grafica di una molecola di DNA mitocondriale di *Eriogyna pyretorum* (Lepidoptera: Saturniidae) (da Jiang *et al.*, 2009)

Nel presente studio è stata scelta la porzione COI, lunga circa 1500 bp e caratterizzata da un alto tasso di evoluzione. La COI è stata determinante in molti studi di filogenesi (Hebert *et al.*, 2003, 2004). Anche per gli imenotteri Chalcidoidei, negli ultimi anni tale porzione mitocondriale è risultata spesso risolutiva nella distinzioni di specie morfologicamente simili (Monti *et al.*, 2005; Gebiola *et al.*, 2009).

Al fine di ottenere l'amplificazione della porzione mitocondriale COI, sono stati utilizzati diversi set di primer (Simon *et al.*, 1994; Schulmeister, 2003) in combinazioni diverse tra loro. Le sequenze dei primer e le condizioni delle reazioni sono riportate di seguito:

Primer	Sequenza 5' - 3'	T (C°)	durata	cicli
C1-J-1718	GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC	94	3'	1
		94	20''	40
		48	20''	
		72	45''	
C1-N-2191	CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC	72	7'	1
		10		
LCO hymF	CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	95	1'	1
HCO outout	GTA AAT ATA TGR TGD GCT C	94	30''	40
		48	1' 30''	
C1-J-1709	AAT TGG WGG WTT YGG AAA YTG	72	1'	
C1-N-2191	CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC	72	7'	1
		10		

3.5.4 Clonaggio e sequenziamento degli ampliconi

Presso il BIRU i prodotti di amplificazioni ottenuti sono stati clonati tramite l'uso del kit di clonaggio *TOPO TA* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), le minipreps plasmidiche sono state preparate utilizzando QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). I sequenziamenti sono stati effettuati presso i laboratori Davis Sequencing (Davis CA, USA).

Presso il DEZA è stata clonata parte degli ampliconi ottenuti. Gli ampliconi sono stati precipitati, ligati nel vettore plasmidico pGEM-T Easy (Promega) e clonati tramite cellule competenti di *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen) seguendo il protocollo del produttore.

Gli ampliconi prodotti presso il DEZA sono stati sottoposti a sequenziamento diretto presso i laboratori BeiJing ZhongKeXiLin Biotechnology Co., Ltd (Cina).

3.5.5 Allineamenti

Le sequenze del gene mitocondriale COI ottenute sono state allineate usando l'algoritmo Clustal W incluso in Bioedit 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Al fine di individuare la presenza di pseudogeni, le sequenze sono state tradotte virtualmente nelle corrispondenti sequenze di amminoacidi per ognuno dei tre codoni, utilizzando *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) software versione 4.0. (Tamura *et al.*, 2007).

Poiché per ITS2 e 28S-D2 il prodotto finale della traduzione è una molecola di RNA, non si necessitano ulteriori informazioni come per la COI, pertanto si può procedere direttamente agli allineamenti.

Per le regioni ribosomali l'allineamento potrebbe risultare alquanto difficoltoso anche se si analizzano regioni altamente conservate. La 28S-D2 infatti presenta alcuni ripiegamenti nella sua struttura secondaria (Gillespie *et al.*, 2005), che non permetterebbero un corretto allineamento tra le molecole. Allo stesso tempo, anche le regioni ITS2 possono risultare difficilmente allineabili tra loro, per la presenza di numerosi eventi di inserzione e delezione di nucleotidi. Gli allineamenti delle sequenze ribosomali sono stati quindi effettuati utilizzando il software per allineamenti multipli *MAFFT* con l'algoritmo G-INS-i (Katoh & Toh, 2008).

Dagli allineamenti delle sequenze ottenute per ciascun marcatore in studio, sono stati calcolati i seguenti parametri:

- composizione nucleotidica (frequenze medie dei quattro nucleotidi);
- numero dei siti variabili (s.v.);
- numero siti informativi per la Massima Parsimonia;

Un ulteriore controllo è stato effettuato verificando manualmente tutte le sequenze per individuare e definire i nucleotidi ambigui.

Inoltre agli allineamenti dei singoli geni sono state aggiunte sequenze omologhe presenti in GenBank per ognuno dei geni presi in esame, 28S-D2 (Tab. 3), COI (Tab. 4) e ITS2 (Tab. 5). Non è stato possibile utilizzare tali sequenze nel data set combinato a causa dell'impossibilità di stabilire se esse appartenessero ad un medesimo individuo di una determinata specie.

Sequenza 28S-D2	Numero accesso	Aplotipo/isolato
<i>A. erythroneurae</i> 1	FJ861034.1	PR09-043
<i>A. erythroneurae</i> 2	FJ861033.1	PR09-042
<i>A. erythroneurae</i> 3	FJ861032.1	GJ06-010
<i>A. erythroneurae</i> 4	FJ861031.1	GJ06-009
<i>A. tretiakovae</i> 1	FJ861030.1	PR09-045
<i>A. tretiakovae</i> 2	FJ861029.1	PR09-044
<i>A. tretiakovae</i> 3	FJ861028.1	GJ06-008
<i>A. tretiakovae</i> 4	FJ861027.1	GJ06-007
<i>A. tretiakovae</i> 5	FJ861026.1	GJ06-006
<i>A. tretiakovae</i> 6	FJ861025.1	GJ06-005
<i>A. tretiakovae</i> 7	FJ861024.1	GJ06-004
<i>A. daanei</i> 1	FJ861023.1	PR08-193
<i>A. daanei</i> 2	FJ861022.1	PR08-002
<i>A. daanei</i> 3	FJ861021.1	PR08-001
<i>A. daanei</i> 4	FJ861020.1	GJ06-003
<i>A. daanei</i> 5	FJ861019.1	PR09-047
<i>A. daanei</i> 6	FJ861018.1	PR09-041
<i>A. daanei</i> 7	FJ861017.1	PR09-040
<i>A. daanei</i> 8	FJ861016.1	PR09-046
<i>A. daanei</i> 9	FJ861015.1	PR08-005
<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861014.1	PFRJ-2009
<i>Anagrus</i> sp 1	FJ861013.1	PR08-004
<i>Anagrus</i> sp 2	FJ861012.1	PR09-038
<i>Anagrus</i> sp 2	FJ861011.1	GJ06-002
<i>A. epos</i> 1	FJ861010.1	PR09-039
<i>A. epos</i> 2	FJ861009.1	GJ06-001

Tab 3. Sequenze del gene 28S-D2 di specie di *Anagrus* provenienti da GenBank

Sequenza COI	Numero accesso	Alotipo/isolato
<i>A. ustulatus</i> 1	EU015031.1	hap 6
<i>A. ustulatus</i> 2	EU015032.1	hap 7
<i>A. ustulatus</i> 3	EU015033.1	hap 8
<i>A. ustulatus</i> 4	EU015034.1	hap 9
<i>A. ustulatus</i> 4	EU015035.1	hap 10
<i>A. ustulatus</i> 6	EU015036.1	hap 11
<i>A. ustulatus</i> 7	EU015037.1	hap 12
<i>A. ustulatus</i> 8	EU015038.1	hap 13
<i>A. ustulatus</i> 9	EU015039.1	hap 19
<i>A. ustulatus</i> 10	EU015040.1	hap 20
<i>A. erythroneurae</i> 1	EU015029.1	hap 17
<i>A. erythroneurae</i> 2	EU015028.1	hap 16
<i>A. erythroneurae</i> 3	DQ922739.1	is 2
<i>A. erythroneurae</i> 4	DQ922738.1	is 1
<i>A. atomus</i> 1	EU015025.1	hap 3
<i>A. atomus</i> 2	EU015026.1	hap 4
<i>A. atomus</i> 3	DQ922736.1	is 1
<i>A. atomus</i> 4	DQ922737.1	is 2
<i>A. atomus</i> 5	EU015027.1	hap 5

Tab 4. Sequenze del gene COI di specie di *Anagrus* provenienti da GenBank

Sequenza ITS2	Numero accesso	Aplotipo	Sequenza ITS2	Numero accesso	Aplotipo
<i>A. ustulatus</i> 1	EU015057.1	7	<i>A. daanei</i> 2	FJ861061.1	PR09-041-2
<i>A. ustulatus</i> 2	EU015056.1	6	<i>A. daanei</i> 3	FJ861060.1	PR09-041-1
<i>A. ustulatus</i> 3	EU015055.1	5	<i>A. daanei</i> 4	FJ861059.1	PR09-040-3
<i>A. ustulatus</i> 4	EU015054.1	4	<i>A. daanei</i> 5	FJ861058.1	PR09-040-2
<i>A. ustulatus</i> 5	EU015053.1	11	<i>A. daanei</i> 6	FJ861057.1	PR09-040-1
<i>A. ustulatus</i> 6	EU015052.1	9	<i>A. daanei</i> 7	FJ861056.1	PR09-047-3
<i>A. ustulatus</i> 7	EU015051.1	7	<i>A. daanei</i> 8	FJ861055.1	PR09-047-2
<i>A. ustulatus</i> 8	EU015050.1	10	<i>A. daanei</i> 9	FJ861054.1	PR09-047-1
<i>A. ustulatus</i> 9	EU015049.1	8	<i>A. daanei</i> 10	FJ861053.1	PR09-046-3
<i>A. ustulatus</i> 10	EU015048.1	16	<i>A. daanei</i> 11	FJ861052.1	PR09-046-2
<i>A. erythroneurae</i> 1	EU015047.1	15	<i>A. daanei</i> 12	FJ861051.1	PR09-046-1
<i>A. erythroneurae</i> 2	EU015046.1	14	<i>A. daanei</i> 13	FJ861050.1	PR08-005-4
<i>A. erythroneurae</i> 3	EU015045.1	13	<i>A. daanei</i> 14	FJ861049.1	PR08-005-3
<i>A. erythroneurae</i> 4	EU015044.1	12	<i>A. daanei</i> 15	FJ861048.1	PR08-005-2
<i>A. erythroneurae</i> 5	FJ861073.1	PR09-043-4	<i>A. daanei</i> 16	FJ861047.1	PR08-005-1
<i>A. erythroneurae</i> 6	FJ861072.1	PR09-043-3	<i>A. daanei</i> 17	FJ861040.1	PR08-193-2
<i>A. erythroneurae</i> 7	FJ861071.1	PR09-043-1	<i>A. daanei</i> 18	FJ861039.1	PR08-193-1
<i>A. erythroneurae</i> 8	FJ861070.1	PR09-042-3	<i>A. daanei</i> 19	FJ861038.1	PR08-002-2
<i>A. erythroneurae</i> 9	FJ861069.1	PR09-042-2	<i>A. daanei</i> 20	FJ861037.1	PR08-002-1
<i>A. erythroneurae</i> 10	FJ861068.1	PR09-042-1	<i>A. daanei</i> 21	FJ861036.1	PR08-001-2
<i>A. atomus</i> 1	EU015043.1	3	<i>A. daanei</i> 22	FJ861035.1	PR08-001-1
<i>A. atomus</i> 2	EU015042.1	2	<i>Anagrus</i> sp.2	FJ861063.1	PR09-038
<i>A. atomus</i> 3	EU015041.1	1	<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861046.1	PR08-192-3
<i>A. tretiakovae</i> 1	FJ861067.1	PR09-045	<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861045.1	PR08-192-2
<i>A. tretiakovae</i> 2	FJ861066.1	PR09-044	<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861044.1	PR08-004-5
<i>A. epos</i> 1	FJ861065.1	PR09-039-2	<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861043.1	PR08-004-4
<i>A. epos</i> 2	FJ861064.1	PR09-039-1	<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861042.1	PR08-004-3
<i>A. daanei</i> 1	FJ861062.1	PR09-041-3	<i>Anagrus</i> sp.1	FJ861041.1	PR08-004-2

Tab 5. Sequenze del gene ITS2 di specie di *Anagrus* provenienti da GenBank

3.5.6 Analisi Filogenetica

Le relazioni evolutive intercorrenti tra le sequenze nucleotidiche possono essere rappresentate in forma grafica mediante un albero filogenetico.

Esistono numerosi metodi che permettono di ricostruire alberi filogenetici a partire da dati molecolari. Nel presente studio gli alberi evolutivi sono stati ottenuti mediante l'applicazione di tre differenti metodi di ricostruzione filogenetica:

- Massima Parsimonia (*Maximum Parsimony*, MP)
- Massima Verosimiglianza (*Maximum likelihood*, ML)
- Analisi Bayesiana (BI)

Tutte le analisi sono state effettuate sia sui singoli geni che su un data set combinato dei tre geni. Come outgroup è stato scelto un individuo appartenente al gruppo morfologico *incarnatus* (AC01).

3.5.6.1 Scelta del modello di sostituzione nucleotidica

Generalmente l'analisi delle distanze è una stima piuttosto grezza dell'effettivo numero di cambiamenti evolutivi avvenuti: un sito nucleotidico potrebbe essere stato sottoposto a ripetute mutazioni nel corso del tempo, il nucleotide osservato oggi, quindi, potrebbe essere il risultato di un susseguirsi di sostituzioni multiple e/o retrosostituzioni. Le sostituzioni più recenti non sono più distinguibili da quelle più remote, e dunque la percentuale di nucleotidi differenti tra due sequenze date, sottostima le modificazioni realmente accadute, in special modo tra le sequenze più distanti. E' risaputo infatti che gli eventi di sostituzione multipla sono direttamente proporzionali al tempo di divergenza (Page & Holmes, 2001).

Con lo scopo di individuare il modello di sostituzione nucleotidica e quindi di evoluzione molecolare che più si avvicina ai dati a disposizione, le

sequenze nucleotidiche sono state analizzate utilizzando il software *jMODELTEST 0.1.1* (Posada, 2008).

3.5.6.2 Massima Parsimonia

Il metodo di *Massima Parsimonia* (MP) utilizza tutta l'informazione contenuta nei dati operando direttamente sui singoli caratteri piuttosto che su matrici di distanza. I possibili alberi filogenetici che risultano da tale analisi corrispondono a quelli che minimizzano il numero di cambiamenti dei caratteri e che assumono il minor numero di eventi evolutivi (in questo caso di mutazioni) per spiegare i dati osservati. In un'analisi di Parsimonia, quindi, vengono considerati solamente i siti per i quali sono rilevabili almeno due differenti tipi di sostituzione nucleotidica, con ciascun tipo di sostituzione presente almeno due volte nell'intero insieme di sequenze analizzate (siti informativi per la parsimonia).

L'analisi della parsimonia è stata effettuata con il software Paup 4.0b10 (Swofford 2000) usando l'interfaccia grafica PaupUp (Calendini & Martin, 2005). L'analisi è stata condotta attraverso una ricerca euristica in cui vengono esaminati soltanto alcune topologie costruendo, in un primo tempo, un albero provvisorio attraverso un algoritmo di addizione graduale (*stepwise addition algorithm*). L'albero provvisorio ottenuto è stato sottoposto ad una sorta di scambio dei rami (*branch swapping*) utilizzando l'algoritmo *tree bisection-reconnection* (TBR) al fine di trovare l'albero più parsimonioso procedendo all'addizione casuale dei taxa. Il metodo di ricerca euristico è stato impostato per 100 repliche con l'opzione "multree" attivata.

La tecnica di *bootstrap* è stata utilizzata per convalidare statisticamente le topologie degli alberi ottenute sia dalla massima parsimonia sia dal *maximum likelihood*. Sono state eseguite 1000 repliche per ogni analisi. I valori di bootstrap maggiori del 70% sono generalmente

considerati forti, tra il 50 ed il 70% moderati e inferiori al 50% deboli (Hillis & Bull, 1993).

3.5.6.3 Maximum Likelihood

Il metodo ML tratta la stima della filogenesi come un problema statistico e la costruzione di un albero attraverso metodi di inferenza statistica, pertanto risulta essere statisticamente consistente per definizione e consente l'impiego di modelli di evoluzione sofisticati e realistici.

L'analisi segue un processo volto a stimare le probabilità che i dati inseriti, in questo caso le sequenze nucleotidiche, possano supportare una determinata topologia di albero filogenetico. Tiene quindi conto contemporaneamente di tutti i dati inseriti e del modello evoluzionistico scelto per la topologia dell'albero e la relativa lunghezza dei rami che massimizzano la verosimiglianza dei dati osservati con il modello considerato. Infine l'albero filogenetico si ottiene dalla topologia che globalmente restituisce la massima verosomiglianza.

L'analisi ML è stata effettuata utilizzando il programma RAxML 7.0.4 (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*, Stamatakis, 2006) eseguendo 1000 inferenze sugli allineamenti originali, utilizzando il modello nucleotidico GTRCAT partendo da un casuale albero parsimonioso.

Il supporto statistico è stato calcolato mediante *bootstrap* come descritto in precedenza.

3.5.6.4 Inferenza Bayesiana

L'inferenza filogenetica bayesiana, proposta da Huelsenbeck *et al.* (2001), è strettamente connessa ai metodi di ML ed è basata su una quantità chiamata *probabilità posteriore* di un albero. La probabilità posteriore è la probabilità che un albero sia corretto, assumendo che il modello evoluzionistico utilizzato sia corretto (Huelsenbeck & Rannala, 2004).

Anche l'analisi Bayesiana è un metodo che si basa sui caratteri ed è applicato ad ogni singolo sito nucleotidico dell'allineamento analizzato. L'inferenza bayesiana si basa su un particolare algoritmo chiamato Monte Carlo Markov Chain (MCMC) che, partendo da un albero casuale con determinati parametri (disposizione e lunghezza rami, tasso di sostituzione e variabilità di siti), attraverso un procedimento a catena in cui ad ogni generazione viene variato uno stato dell'albero, permette di esplorare i vari alberi e di accettarli o rigettarli sulla base della loro verosomiglianza. All'aumentare del numero di generazioni il processo tenderà a stabilizzarsi su un set di alberi con più o meno gli stessi valori di *likelihood*, convergendo verso un valore stabile. Al termine, i software per l'inferenza bayesiana, costruiscono un albero di consenso la cui topologia riassume quella degli alberi contenuti nel set.

Nel presente lavoro, implementando gli allineamenti nel software MrBayes 3.1.2 (*Bayesian inference of phylogenetic trees*) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), sono state simulate 5000000 di generazioni per ogni dataset. Gli alberi sono stati campionati ogni 5000 generazioni per un totale di 1000 alberi, e il primo 25% degli alberi è stato scartato come "burnin". I cladi sono stati considerati significativamente supportati se la probabilità a posteriori > 95%.

3.5.6.5. Stima dei Network di Parsimonia

Le relazioni tra gli aplotipi individuati per ogni gene sono state analizzate utilizzando il programma *TCSv 1.21* (Clement *et al.*, 2000) basato sulla parsimonia statistica (Castelloe & Templeton, 1994). Tale software permette di indagare le relazioni tra aplotipi strettamente correlati, come quelli nelle indagini intraspecifiche (Posada & Crandall, 2001). In breve *TCS* analizza le sequenze nucleotidiche tramite un algoritmo di parsimonia statistica, 'collassa' in un unico aplotipo quelle identiche e

calcola la frequenza di ciascuno di questi aplotipi nel campione. Il programma costruisce quindi un network di parsimonia statistica dove gli aplotipi sono interconnessi da 'nodi', ognuno dei quali rappresenta un evento mutazionale che differenzia un aplotipo dall'altro. Viene dapprima identificato l'aplotipo più ancestrale da cui deriveranno gli altri aplotipi sulla base degli eventi mutazionali che lo distanziano dall'aplotipo ancestrale. Gli aplotipi sono collegati al network solo se hanno un livello di confidenza alto (90-99%). Il livello di confidenza rappresenta un numero massimo di eventi mutazionali che un aplotipo può avere per essere connesso al network, di conseguenza gli aplotipi che presentano un numero maggiore di mutazioni non appartengono al network creato. Hart & Sunday (2007) hanno dimostrato che in genere, usando un limite di connessione del 95%, sequenze di DNA di una singola specie formano un unico network, mentre a network separati corrispondono specie biologiche distinte.

3.5.6.6 Analisi delle Distanze Genetiche

Le distanze genetiche tra i gruppi ed all'interno dei gruppi sono state calcolate usando il software MEGA4 utilizzando il metodo *p*-distance (pairwise distance), cioè la proporzione dei siti nucleotidici dove due sequenze confrontate differiscono tra loro, ottenuta dividendo il numero di nucleotidi differenti per il numero totale dei nucleotidi confrontati (Nei & Kumar, 2000).

3.6 Intersimple Sequence Repeat ISSR-PCR DNA fingerprinting

I primi studi in cui sono stati impiegati marcatori ISSR sono stati pubblicati nel 1994 (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1994).

La tecnica ISSR permette di ottenere un'impronta molecolare dell'organismo in esame, definito fingerprinting, rappresentata da un profilo

di bande di amplificazione. Essa è una modifica della tecnica PCR, dalla quale differisce nell'utilizzo di un unico primer su entrambi i filamenti; la PCR invece richiede due differenti oligonucleotidi, un forward ed un reverse, la cui sequenza in basi è fissata in base alla regione che si vuole amplificare. I primer utilizzati nell'ISSR hanno una lunghezza compresa tra 18 e 23 nucleotidi e le loro sequenze sono disegnate all'interno delle regioni microsatellitari, loci ipervariabili che contengono ripetizioni in tandem di 2-5 bp. Quando il primer riconosce due siti complementari localizzati sulle due eliche ad una distanza di 1-2 kb, innesca la reazione di amplificazione della porzione di DNA compresa tra questi due siti (Fig. 7). I frammenti amplificati tramite questa tecnica vengono visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

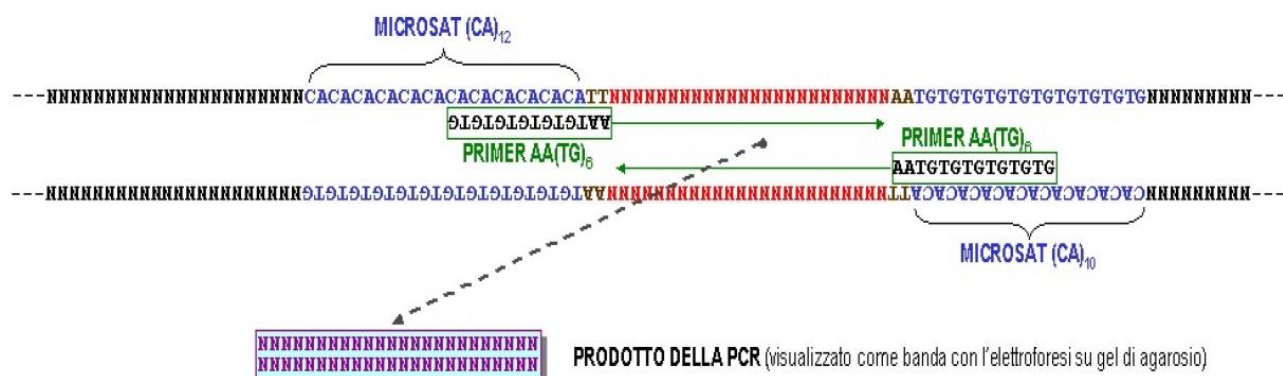


Fig 7. Immagine che schematizza la modalità di amplificazione della tecnica ISSR-PCR.
(da Lai *et al.* 2005)

Le bande prodotte possono essere distinte in due classi: bande polimorfiche o individuo-specifiche e monomorfiche cioè filogeneticamente conservate. I polimorfismi, evidenziati come presenza o assenza di una banda, rappresentano il risultato di mutazioni nei siti di appaiamento del primer, come sostituzioni, inserzioni o delezioni anche di singoli o pochi nucleotidi (Williams *et al.*, 1990).

I marcatori ISSR sono oggi molto utilizzati per studi di variabilità genetica e nel rilevare relazioni tassonomiche a livello di specie. Inoltre risultano utili anche in indagini filogeografiche, dove l'analisi filogenetica è messa in relazione alle informazioni geografiche ed ecologiche. Infatti l'analisi dei profili di amplificazione può evidenziare caratteri specifici propri di una determinata popolazione e mettere in relazione popolazioni provenienti da diverse aree geografiche. Tale applicazione ha ottenuto successo in alcuni studi su specie di *Gonatocerus* Nees, ad esempio, *G. morrilli* (Howard) (Hymenoptera: Mymaridae) e *G. walkerjonesi* S. Triapitsyn (de León *et al.*, 2004, 2006) e il complesso del *G. tuberculifemur* (Ogloblin) (de León *et al.*, 2008b).

Le reazioni di amplificazioni per la tecnica ISSR-PCR sono state eseguite come precedentemente descritto de León *et al.* (2008).

Le reazioni sono state effettuate tramite l'utilizzo del primer HVH(TG)7T (Zietkiewicz *et al.*, 1994) dove H= A/T/C e V= G/C/A ed i componenti sono riportati di seguito: 1X PCR buffer (50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5mM MgCl₂, e 0.01% gelatina) 0.25mM dNTPs, 0.25 mM primer e 0.05U/ml Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) ed infine 1 µl di templat. Le reazioni di amplificazione hanno seguito i parametri descritti: 1 ciclo di denaturazione a 94°C per 2 minuti, 45 cicli (94°C per 1 min, 50°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuti), una fase di estensione finale a 72°C per 2 min.

I prodotti di amplificazione sono stati quindi concentrati sino ad 8 µl e sono stati quindi fatti correre per 7 ore a 90V su un gel di agarosio al 2% in un buffer di 1X TBE (90mM Tris-borato, 2mM EDTA) in presenza di 0.2 µl/ml di bromuro d'etidio.

I gel ottenuti sono stati fotografati con Chemi Doc System e le bande individuate tramite *Quantity One Software™* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3.7 Studio degli endosimbionti

3.7.1 Individuazione tramite DGGE

La DGGE *Denaturing gradient gel electrophoresis* è una tecnica che permette la separazione di molecole di DNA prodotte da PCR grazie ad elettroforesi su gel di poliacrilammide in gradiente denaturante di urea e formamide. Questa tecnica introdotta da Muyzer *et al.* (1993) è correntemente impiegata in molti laboratori per studiare la biodiversità di comunità microbiche in campioni ambientali e alimentari (Ercolini, 2004; Muyzer *et al.*, 1995; Muyzer & Smalla, 1998; Dar *et al.*, 2005).

La DGGE consente di separare frammenti di DNA dello stesso peso molecolare, ma caratterizzati da una differente sequenza di basi nucleotidiche (Muyzer *et al.*, 1993), anche quando questa differenza è rappresentata da una sola coppia di basi.

Essa si basa sul principio secondo cui molecole di DNA, sottoposte durante la corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide a un gradiente di agenti denaturanti (urea e formamide), si denaturano, cambiando conformazione, e rallentano la velocità di migrazione sul gel stesso. Durante la corsa elettroforetica infatti, il frammento raggiunge la posizione in cui la concentrazione degli agenti denaturanti eguaglia l'effetto della temperatura di *melting* (T_m) del suo più basso *dominio di melting*, causando la sua parziale denaturazione e il conseguente rallentamento nella velocità di migrazione sul gel. La transizione da doppio filamento a filamenti parzialmente denaturati avviene in un intervallo molto stretto e, talvolta, può capitare che i frammenti tendano a denaturarsi completamente e non arrestano la loro corsa sul gel. Per ovviare a questo inconveniente, nella PCR che precede la DGGE, uno dei due primer utilizzati presenta (all'estremità 5' o al 3') una sequenza ricca di GC detta GC-clamp. Le GC-clamps, lunghe circa quaranta basi, avendo una T_m alta, impediscono la completa denaturazione del frammento di DNA durante la corsa

elettroforetica (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989) determinandone quindi l'arresto sul gel.

Il protocollo per la DGGE ha previsto due reazioni di amplificazione. Nella prima reazione, si è amplificata una porzione della 16S rDNA batterica tramite l'utilizzo di primer universali 27f e 1513r (Weisburg *et al.*, 1991) che amplificano una regione di 1500 paia di basi della 16s comune a tutti gli eubatteri. Le sequenze dei primer con il relativo programma di amplificazione sono sintetizzati nella tabella seguente:

Primer	Sequenza 5' - 3'	T (C°)	durata	cicli
27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	94	3'	1
		94	45''	35
		52	1'	
1513r	ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT	72	2'	1
		72	5'	
		10		

Conseguentemente, gli amplificati ottenuti sono stati utilizzati come templati nella seconda amplificazione. In tale reazione sono stati utilizzati i primer generici 341fgc e 518r (Ercolini *et al.*, 2004). Tale coppia di primer riconosce una porzione più interna della 16S che amplifica un frammento di 217 paia di basi.

Con lo scopo di incrementare la specificità dell'amplificazione e ridurre la formazione di impurità dai prodotti, è stata realizzata una "touchdown" PCR (Muyzer *et al.*, 1993). Il programma di amplificazione per la touchdown prevede che la temperatura di annealing nei primi 20 cicli decresca di 0.5°C per ogni ciclo partendo da una temperatura di 65° nel primo ciclo e raggiungendo quindi i 55°C nell'ultimo ciclo. La seguente tabella riassume il programma di amplificazione e le sequenze dei primer utilizzati.

Primer	Sequenza 5' - 3'	T (C°)	durata	cicli
341fgc	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG	94	3'	1
		94	50''	20
		65 → 55	45''	
		72	45''	
		94	50''	15
518r	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G	55	45	
		72	45''	
		72	7	1
		10		

Le reazioni PCR sono state preparate in un volume finale di 20 µl contenente 1X buffer Promega PCR, 0.2 mM di ogni deossinucleotide trifosfato, 0.5 µM di ogni primer e 1.5 unità di GoTaq DNA polimerasi (Promega), usando 2 µl di DNA come template.

Per ogni reazione è stato aggiunto un campione di prova contenente acqua al posto di DNA per verificare l'assenza di contaminazioni. Una volta terminata la PCR 2 µl di ogni amplificato sono stati controllati su gel d'agarosio, al 2%, per valutare l'efficienza della reazione, la qualità, e quindi la quantità.

Sul gel della DGGE, come riferimento, sono stati utilizzate i prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione delle 16S rDNA dei più diffusi batteri endosimbionti (Tab. 6), coinvolti in alterazioni della riproduzione, riportati in letteratura e dell'*E. coli*, in quanto uno dei contaminanti potenziali.

Fonte	Endosimbionte associato
<i>Encarsia formosa</i> Gahan	<i>Wolbachia</i>
<i>Pnigalio soemius</i> (Walker)	<i>Rickettsia</i>
<i>Encarsia meritoria</i> Gahan	<i>Cardinium</i>
<i>E. coli</i>	

Tab.6. Ampliconi della 16S batterica utilizzati come riferimento in DGGE.

Circa 300 ng di prodotti della PCR - touchdown sono stati caricati su un gel di acrilammide all'8% (37:1 acrilammide : bisacrilammide) con un

gradiente denaturante dal 35% al 60%, in 0.5X tampone TAE. Per la polimerizzazione del gel è stata impiegata Tetrametiletilendiammina (Temed) in combinazione con Ammonio persolfato (APS).

Un gel privo degli agenti denaturanti è stato impiegato come stacking gel al fine di permettere ai prodotti PCR l'inizio della corsa in modo omogeneo.

I gel sono stati sottoposti a corsa elettroforetica a 40V per 15 min nella fase iniziale e a 90V per 17 ore in un tampone 0.5 X TAE ad una temperatura costante di 60°C nell'apparato DGGE dell'Elettrofor-Scientific Instruments. Dopo la corsa i gel sono stati colorati per 15 minuti in tampone 0.5X TAE contenente bromuro di etidio (0.5µg/ml), decolorati per 20 minuti in acqua deionizzata, il DNA quindi è stato visualizzato su un transilluminatore a raggi UV e fotografato.

La visualizzazione e digitalizzazione delle immagini dei gel ottenuti sono state effettuate con Chemi Doc System e Quantity One Software™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3.7.2 Multilocus Sequence Typing System

Dai risultati ottenuti sottoponendo i campioni all'analisi DGGE è emerso che negli individui di *A. ustulatus* provenienti da *Q. ilex* vi era la presenza di *Wolbachia*. Si è proceduto quindi alla caratterizzazione dell'endosimbionte batterico.

La caratterizzazione della *Wolbachia* ritrovata in specie di *Anagrus* ha seguito il protocollo previsto per il *Multi Locus Sequence Typing* system (MLST) descritto in Baldo *et al.* (2006).

Il MLST system si basa su 5 geni conservati *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ*, *fbpA* più un gene codificante per la proteina di superficie dell'alpha batterio (*wsp*). In breve il gene *gatB* codifica per la sub unità B dell' glutammina t-RNA amidotransferasi; *coxA* codifica per la sub unità I della citocromo c ossidasi; *hcpA* codifica per una proteina non caratterizzata, ma altamente

conservata in molti batteri; *ftsZ* codifica per una proteina implicata nella divisione cellulare e in ultimo il gene *fbpA* codifica per la fruttosio-bifosfato aldolasi.

Il sistema *MLST* ha previsto l'amplificazione dei geni succitati utilizzando le coppie di primer e le relative temperature di annealing indicati in tabella 7.

Le reazioni di amplificazioni sono state effettuate in un volume finale di 40 µl composto dai seguenti reagenti: 4 µl di Buffer 1X (1.5 mM MgCl₂), 3.2 µl dNTPs (0.2mM), 4 µl primer F, 4 µl primer R, 0.4 µl taq DNA polymerase (0.5U), H₂O sterile sino a volume.

Le condizioni delle amplificazioni sono state le seguenti: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti; 94°C per 30 sec, T° di annealing variabile a seconda dei primer per 45 sec, 72°C per 90 sec ripetuti ciclicamente per 37 volte; elongation finale 72°C per 10 minuti.

Gene	Sequenza primer	Prodotto bp	Annealing T°
<i>gatB</i>	gatB_F1: GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT gatB_R1: TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	471	54°C
<i>coxA</i>	coxA_F1: TTGGRGCRATYAAC TTTATAG coxA_R1: CTAAAGACTTTKACRCCAGT	487	54°C
<i>hcpA</i>	hcpA_F1: GAAATARCAGTTGCTGCAAA hcpA_R1: GAAAGTYRAGCAAGYTCTG	515	54°C
<i>ftsZ</i>	ftsZ_F1: ATYATGGARCATATAAARGATAG ftsZ_R1: TCR AGY AAT GGA TTR GAT AT	524	54°C
<i>fbpA</i>	fbpA_F1: GCT GCT CCR CTT GGY WTG AT fbpA_R1: CCRCCAGARAAAAYYACTATTC	509	59°C
<i>wsp</i>	wsp_F1: GTCCAATARSTGATGARGAAAC wsp_R1: CYGCACCAAYAGYRCTRTAAA	603	59°C

Tab.7. Coppie di primer, relative T° di annealing e dimensioni dei frammenti ottenuti per ognuno dei geni utilizzati nel MLST System

Ottenuti gli amplificati, sono stati sequenziati ed inseriti nel *Wolbachia MLST* <http://pubmlst.org/wolbachia/> per la caratterizzazione del supergruppo di appartenenza.

3.8 Studi morfometrici

3.8.1 Preparazione dei campioni

Successivamente ai processi di estrazione di DNA genomico i campioni sono stati completamente puliti da residui della soluzione Chelex tramite ripetuti passaggio in alcool al 70%.

I campioni utilizzati per le analisi molecolari sono stati trattati e montati su vetrini da microscopia come descritto di seguito.

I campioni posti in pozzetti contenenti una soluzione di idrossido di potassio al 10% per circa 40 minuti. In seguito alcune gocce di acido acetico glaciale sono state aggiunte a tale soluzione per evitare uno stress osmotico troppo spinto. Dopo qualche minuto il campione è stato prelevato ed immerso in acido acetico glaciale per 40 min. Al fine di ottenere la migliore disidratazione e chiarificazione dei tessuti, i campioni sono stati trasferiti su vetrini a goccia pendente e immersi in una soluzione alcolica fenolata al 50% per 10 min. Si è quindi proceduto alla dissezione in una soluzione alcolica fenolata al 100%. Al termine, le parti sezionate del campione sono state adagiate in una goccia di balsamo fenolo (50:50 balsamo del Canada: soluzione alcolica fenolata al 100%) posta su un vetrino portaoggetti. Dopo aver posizionato le parti sezionate nel modo più opportuno, esse sono state coperte con dei vetrini copri oggetto ed essiccati in stufa a 40°C per circa 2 settimane.

I campioni così preparati sono stati fotografati tramite l'utilizzo di un microscopio Zeiss Axiophot 2 collegato ad una telecamera digitale AxioCam HRc. Quindi si è proceduto alla misurazione dei caratteri previsti dalla tassonomia tramite il software AxioVision version 4.5.

I campioni sono conservati presso le collezioni del Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria “Filippo Silvestri”, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

3.8.2 Analisi morfometrica

Per effettuare l'analisi morfometrica sono stati utilizzati solo campioni femminili: 14 provenienti da *Q. ilex*, 15 provenienti da *Mentha* sp. e 11 provenienti da *Salvia* sp..

I dati morfologici sono stati confrontati prima tramite approccio ad una variabile. Conseguentemente sono stati analizzati con metodo multivariato utilizzando l'Analisi Discriminante Canonica (CDA). Entrambe le analisi sono state svolte utilizzando il software *Statgraphics plus 5.1*.

I caratteri e i rapporti derivati sono mostrati nella tabella 8.

Carattere	Sigla
Lunghezza dello scapo	SC
Lunghezza del pedicello	Pe
Lunghezza del primo segmento del funicolo	F1
Lunghezza del secondo segmento del funicolo	F2
Lunghezza del terzo segmento del funicolo	F3
Lunghezza del quarto segmento del funicolo	F4
Lunghezza del quinto segmento del funicolo	F5
Lunghezza del sesto segmento del funicolo	F6
Lunghezza della clava	LC
Larghezza della clava	WC
Lunghezza dell'ala anteriore	Lfw
Larghezza ala anteriore	Wfw
Lunghezza dell'ala posteriore	Lhw
Lunghezza dell'ovopositore	LO
Lunghezza della protibia	Lft
Lunghezza della metatibia	Lmt
Lunghezza totale funicolo	Ftot
Lunghezza frangia marginale più lunga ala anteriore	Flms
Rapporto	Sigla
Ovopositore/protibia (lunghezze)	LO/ Lft
Ovopositore/metatibia (lunghezze)	LO/Lmt
Lunghezza/larghezza ala anteriore	Lfw/Wfw
Frangia marginale più lunga ala anteriore/ larghezza ala anteriore	Flms/Wfw
Funicolo/clava (lunghezze)	Ftot/LC

Tab. 8. Caratteri e rapporti derivati presi in esame per l'analisi morfometrica.

4. RISULTATI

4.1 Allevamenti e Crossing Test

Dall'allevamento I (*Mentha* sp. – *E. zelleri* – *A. ustulatus*) sono state ottenute 3 generazioni successive mentre nel sistema II (*Salvia* sp. – *E. decemnotata* – *A. atomus*) è stata ottenuta una sola generazione (Tab. 9).

Sistema	Generazione					
	I		II		III	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>Mentha</i> sp. - <i>E. zelleri</i> - <i>A. ustulatus</i>	4	8	2	9	8	7
<i>Salvia</i> sp. - <i>E. decemnotata</i> - <i>A. atomus</i>	10	3	0	0	0	0

Tab. 9. Individui di *Anagrus* ottenuti dai sistemi di allevamento impiegati

Preliminarmente sono stati monitorate coppie di *Anagrus* provenienti da uno dei due sistemi precedentemente menzionati al fine di osservare i comportamenti durante la fase dell'accoppiamento. E' quindi emersa un'interazione tra gli individui quasi immediata, in quanto il maschio cominciava a ricercare le femmina e, giunto in prossimità di questa, agitava freneticamente le ali. L'azione successiva consisteva nel salire sulla femmina e cominciare la copula. Il tutto durava appena 10 secondi, trascorsi i quali, il maschio si lasciava cadere dietro la femmina, talvolta restando ancora ancorato ad essa con le zampe posteriori e l'organo copulatore.

Sono state effettuate poche prove di accoppiamento incrociato, in quanto si sono riscontrati problemi legati gestione di tali microimenotteri ed all'alta mortalità larvale e pupale negli allevamenti.

I crossing test effettuati in questo lavoro hanno avuto risultati negativi, gli individui inseriti nelle arene di accoppiamento non hanno mostrato alcuna interazione e pertanto non è avvenuto alcun accoppiamento tra gli individui provenienti dai sistemi diversi (Tab. 10). Da questi dati emergerebbe un isolamento riproduttivo tra le unità saggiate.

♂	♀	Esito +/-
Salvia 2	Mentha 1	—
Salvia 4	Mentha 6	—
Salvia 5	Mentha 7	—
	Mentha 8	—
Salvia 20	Mentha 12	—
Mentha 13	Salvia 14	—
	Salvia 15	—
Mentha 17	Salvia 17	—
	Salvia 18	—

Tab. 10. Coppie di *Anagrus* provenienti dai sistemi *Mentha* sp. e *Salvia* sp. utilizzati nei crossing test e relativo esito.

4.2 Studio del Sistema *Q. ilex* – *L. aurovittata* – *A. ustulatus*

4.2.1 Catture trappole

I dati delle catture di adulti di *L. aurovittata* e *Anagrus* su trappole cromotropiche sono riportati nel grafico 1.

Adulti di *L. aurovittata* sono stati catturati già nei giorni seguenti l'installazione delle trappole (85 individui); si è assistito quindi ad un progressivo decremento delle catture della cicalina sino alla fine del mese di aprile.

Diversi individui di *Anagrus* sono stati catturati durante tutto il periodo invernale; un picco delle catture si è verificato dalla terza settimana di febbraio alla fine del mese di marzo in cui sono stati catturati 94 *Anagrus*. Si è verificato quindi un decremento delle catture sino ad aprile.

Gli individui di *Anagrus* prelevati dalle trappole ed esaminati in preparati microscopici sono risultati tutti di sesso femminile.

4.2.2 Rilevamento degli stadi preimmaginali di *Anagrus*

I risultati dei campionamenti effettuati sulle foglie di leccio dal novembre 2009 all'aprile 2010 sono riportati nel grafico 2. Essi hanno messo in evidenza uova sane di *L. aurovittata* con due picchi registrati a gennaio (17 uova sane) e febbraio (29 uova sane). Inoltre da tali campionamenti sono state rilevate uova di cicalina apparentemente parassitizzate, in cui erano visibili larve o pupe di *Anagrus*. Un picco nel numero di pupe di *A. ustulatus* si è verificato dalla fine del mese febbraio sino alla prima decade di marzo dove sono state registrate rispettivamente 12 e 14 uova. Dall'isolamento delle uova parassitizzate, mantenute a temperatura ambiente, sono emersi *Anagrus* di sesso femminile sino al mese di aprile. Da questo periodo le larve isolate non hanno proseguito nel loro sviluppo rimanendo nello stadio di larva di seconda età (o intermedia) per lunghi periodi, sino al disseccamento del supporto vegetale.

Tale dato è stato anche confermato dalle uova monitorate direttamente su pianta. Inoltre, in quest'ultime, le larve di *Anagrus* sono rimaste nello stesso stadio durante tutta la primavera e l'estate successiva (Figg. 8-9). Esse hanno ripreso lo sviluppo in autunno, per poi impuparsi e dare luogo all'emergenza degli adulti nel tardo autunno-inizio inverno. L'arresto dello sviluppo larvale di *Anagrus* in primavera è stato confermato anche nel 2011.

Stadi preimmaginali di *Lindbergina* sono stati rilevati a partire dalla fine di aprile.

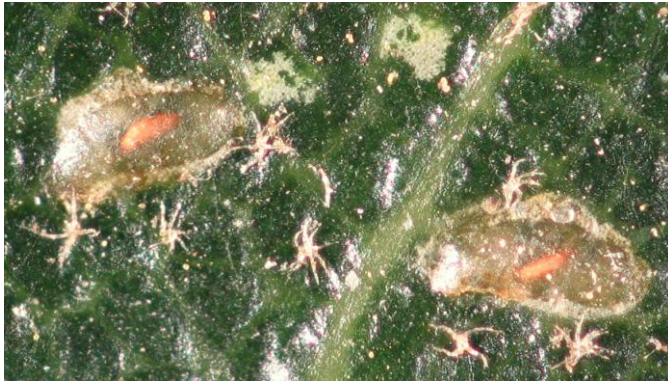
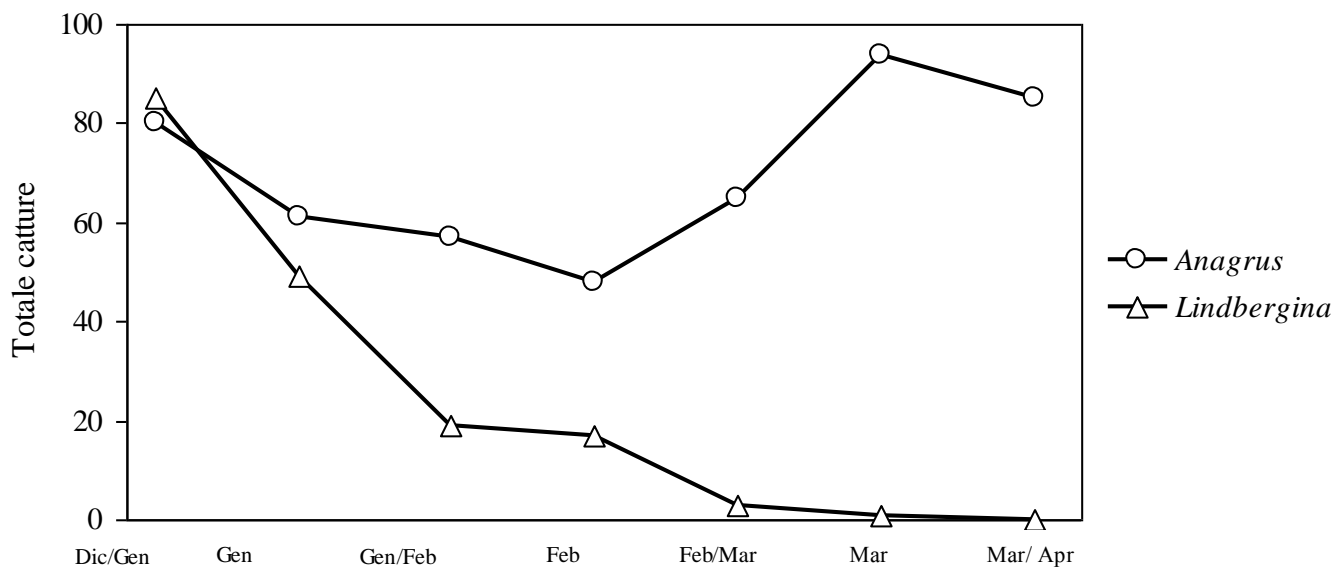


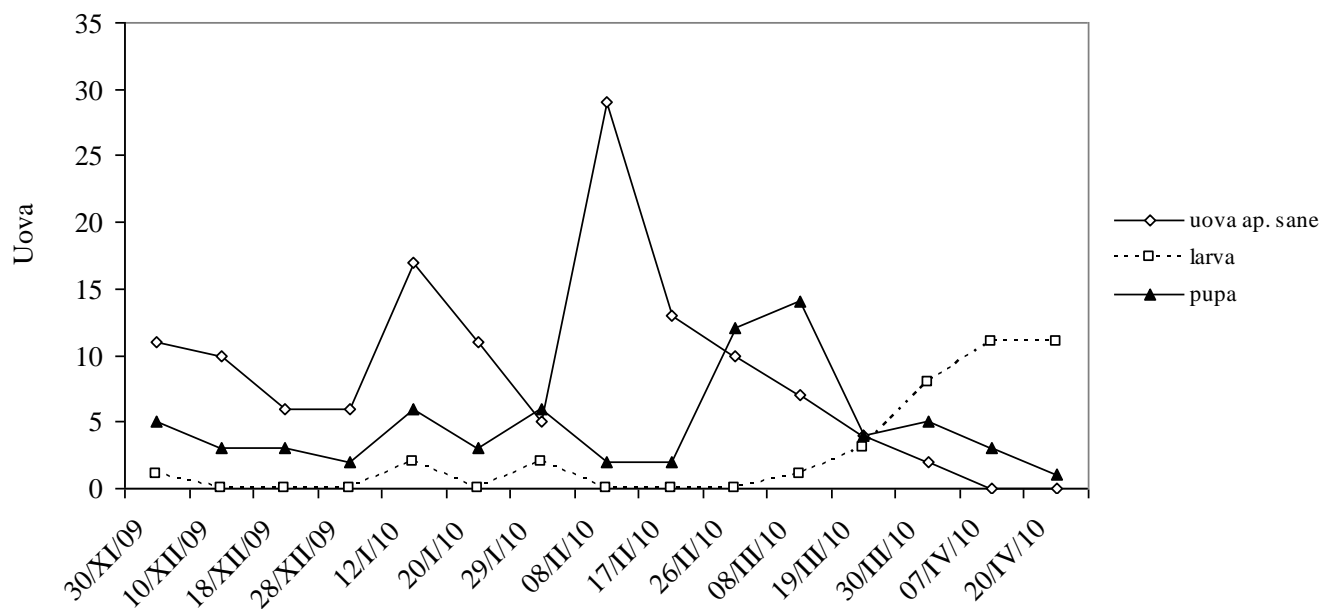
Fig 8. Uova di *L. aurovittata* in cui sono visibili larve intermedie di *Anagrus*



Fig. 9. Larva intermedia di *Anagrus*.



Graf. 1. Catture di *Anagrus* su trappole cromotropiche gialle in lecceta del Parco Gussone (Portici, NA) da dicembre 2009 ad aprile 2010



Graf. 2. Rilevamenti di uova apparentemente sane e parassitizzate di *L. aurovittata* nel periodo novembre 2009- aprile 2010.

4.3 ANALISI MOLECOLARE

4.3.1. Analisi Delle Sequenze

Per la regione ribosomale 28S-D2 sono stati ottenute 41 sequenze così come per il gene mitocondriale COI. Per il gene ribosomale ITS2, per i gruppi MEN e SAL, il sequenziamento diretto è spesso fallito in quanto gli elettroferogrammi hanno riportato diversi doppi picchi dovuti probabilmente alla presenza di copie multiple all'interno dello stesso individuo (polimorfismo intraindividuale). Pertanto, allo scopo di ottenere sequenze prive di nucleotidi ambigui, si è dovuto ricorrere spesso al clonaggio. In totale sono state quindi ottenute 42 sequenze di ITS2.

Il data set completo dei 3 geni è stato invece ottenuto per 36 individui come indicato nella seguente tabella.

Gene	QUE	SAL	MEN	Altri
28S-D2	13	10	13	4 A.EN. + AC01
ITS2	13	10	14	4 A.EN. + AC01
COI	14	9	13	4 A.EN. + AC01
Data set	11	11	9	4 A.EN. + AC01

La composizione nucleotidica delle sequenze di 28S-D2 è indicata di seguito: T=22.5%, C=24.5%, A=23.6% e G=29.3%. Le sequenze ottenute variano da un minimo di 583 ad un massimo di 621 bp, e l'allineamento finale utilizzato nelle analisi filogenetiche dopo l'integrazione con le sequenze di *Anagrus* disponibili in GenBank (Tab.XX) consiste in 589bp. Tra i nucleotidi di tali sequenze, 517 sono risultati costanti, 21 non informativi e 4 informativi.

Le sequenze della porzione mitocondriale COI mostrano una composizione nucleotidica media di T=45.6%, C=11.8%, A=29.7% e G=12.9%. Gli allineamenti risultanti dopo l'integrazione con le sequenze della COI di specie di *Anagrus* da GenBank consistono in 518 bp. I

nucleotidi risultati costanti per la COI sono 407, i non informativi ammontano a 54 mentre i nucleotidi informativi risultano essere 58.

Per la ITS2, le sequenze variano da un minimo di 492 bp ad un massimo di 602 bp con una composizione percentuale di T=26.6%, C=23.3%, A=23% e G=27.1%. Ulteriori sequenze provenienti da GenBank sono state integrate e l'allineamento finale è di 761bp. I nucleotidi costanti ammontano a 401, i non informativi a 124 mentre i nucleotidi informativi sono 55.

4.3.2 Analisi Filogenetica

L'utilizzo del software *jMODELTEST 0.1.1* ha permesso di identificare i modelli di sostituzione nucleotidica più adatti agli allineamenti ottenuti e sono riportati in tabella 11.

Data set	Modello
28S-D2	GTR+Gamma+Inv
ITS2	GTR+G
COI	TiM+I+G
28S-D2 + ITS2 + COI	GTR+Gamma+Inv

Tab.11. Modelli di sostituzione nucleotidica individuati per ogni set di geni

La ricostruzione filogenetica dei set singoli di geni 28-D2, ITS2 e COI così come del data set combinato dei tre geni effettuata con metodi differenti (MP, ML e BI) ha prodotto alberi filogenetici di simile topologia.

Dall'analisi filogenetica effettuata sulla regione D2 del gene 28S di specie di *Anagrus* (Fig.10) sono stati ottenuti alberi di identica topologia per i 3 metodi. La MP ha prodotto 83 alberi ugualmente parsimoniosi (Lunghezza dell'albero (TL) = 161 step; indice di consistenza (CI) = 0.907 ed indice di ritenzione (RI) = 0.978).

Come si poteva ipotizzare per un gene ad evoluzione lenta, tale albero non è risolutivo a livello di specie, ma riesce a delineare 3 cladi separati all'interno del genere.

Si nota infatti un clade che comprende le specie appartenenti al complesso “*epos*”, un clade che racchiude gli individui appartenenti alla specie *A. tretiakovae* con forte supporto bootstrap (BI=1; ML=100; MP=100) ed in ultimo clade che include le specie del gruppo *atomus* che sono l'oggetto del presente studio (SAL, MEN, QUE e A.EN.) e gli individui di *A. erythroneurae*. In tale clade si distingue un ulteriore clade che racchiude tutti gli *Anagrus* QUE ma tale gruppo non è ben supportato.

L'analisi filogenetica delle sequenze della regione spaziatrice ribosomale ITS2 ha prodotto alberi topologicamente identici con i tre metodi (Fig. 11). La MP ha prodotto 32 alberi ugualmente parsimoniosi (TL= 620; CI= 0.769 e RI=0.970). In base a tale analisi, è possibile delineare tre cladi all'interno del genere, coincidenti con i cladi ritrovati nell'analisi della 28S. Un primo clade include individui del complesso “*epos*” molto affine all'outgroup (AC01), un secondo clade in cui sono presenti gli individui di *A. tretiakovae* ed un terzo clade comprendente le specie del gruppo *atomus*. All'interno di questo ultimo clade si osservano due gruppi monofiletici ben supportati (bootstrap=1/100/100): dal primo si dipartono tre cladi il primo dei quali include tutti gli individui QUE, il secondo gli individui di *A. erythroneurae* ed infine un terzo clade includente un individuo *A. ustulatus*, un *A. atomus* ed M8. Nel secondo clade si riconoscono due ulteriori complessi. Nel primo si concentrano un individuo di *A. ustulatus* e due individui SAL (S16-S17) e due MEN (M7-5 e M6-24). Riguardo al secondo complesso si può notare invece una serie di raggruppamenti eterogenei in cui si riconosce un gruppo includente *A. ustulatus* H8, M7 e M6-31; un secondo gruppo in cui si formano due ulteriori cladi. Uno dei quali include due individui *A. atomus* e cinque individui SAL (S8, S25, S22, S18 ed S1); l'altro comprende sei individui di

A. ustulatus, parte di MEN (M1, M2, M15, M4, M6, M14, M5, M9 ed M7-12), gli individui S6 ed S13 ed infine gli individui del gruppo A.EN.

Le tre filogenesi delle sequenze del frammento del gene mitocondriale COI sono risultate in alberi di identica topologia (Fig.12). La MP ha prodotto 2122 alberi ugualmente parsimoniosi (TL=205; CI=0.678; RI=0.873) che è in gran parte non supportato. E' possibile delineare tre cladi all'interno del genere. Un primo clade raggruppa tutti gli individui di *A. atomus* presenti in genbank, insieme agli individui S18, S25, S22 e agli *A. atomus* inglesi (A.EN. 10-11-12-13) (BI=1; ML=100; MP=100). All'interno di questo gruppo si distingue un clade includente alcuni individui del gruppo QUE (Q8-Q9-Q14-Q13-Q12-Q10-Q9-Q5-Q4-Q3-Q2). Un secondo clade, non supportato, raggruppa le sequenze COI degli individui di *A. ustulatus* presenti in genbank e tutti i campioni MEN e i restanti campioni del gruppo SAL.

Un ultimo clade, anch'esso non supportato, risulta raggruppare tutti gli individui di *A. erythroneuræ* e due *A.ustulatus* (H19 e H20) più tre individui del gruppo QUE (Q1-Q6-Q11).

Riguardo al data set combinato di 28S-D2, ITS2 e COI (Fig. 13), i tre metodi hanno prodotto alberi di identica topologia. Per la MP, sono stati prodotti 83 alberi ugualmente parsimoniosi (TL=501; CI=0.749; RI=0.835). Si può notare la presenza di un singolo clade in cui sono raggruppati tutti gli individui presi in esame. All'interno di tale clade si distinguono tre cladi principali. Il primo raggruppa parte degli individui MEN e SAL; il secondo racchiude quattro individui del gruppo SAL e i quattro individui di A. EN con un forte supporto bootstrap per i tre metodi utilizzati. L'ultimo clade raggruppa i restanti individui dei gruppi SAL e MEN e si nota un ulteriore clade che include tutti gli individui del gruppo QUE con un forte supporto sia in MP che in BI. In questo clade si può notare ancora la presenza di un clade con forte supporto bootstrap che raggruppa gli individui Q1, Q6 e Q11, situazione analoga alla filogenesi basata sul gene mitocondriale COI.

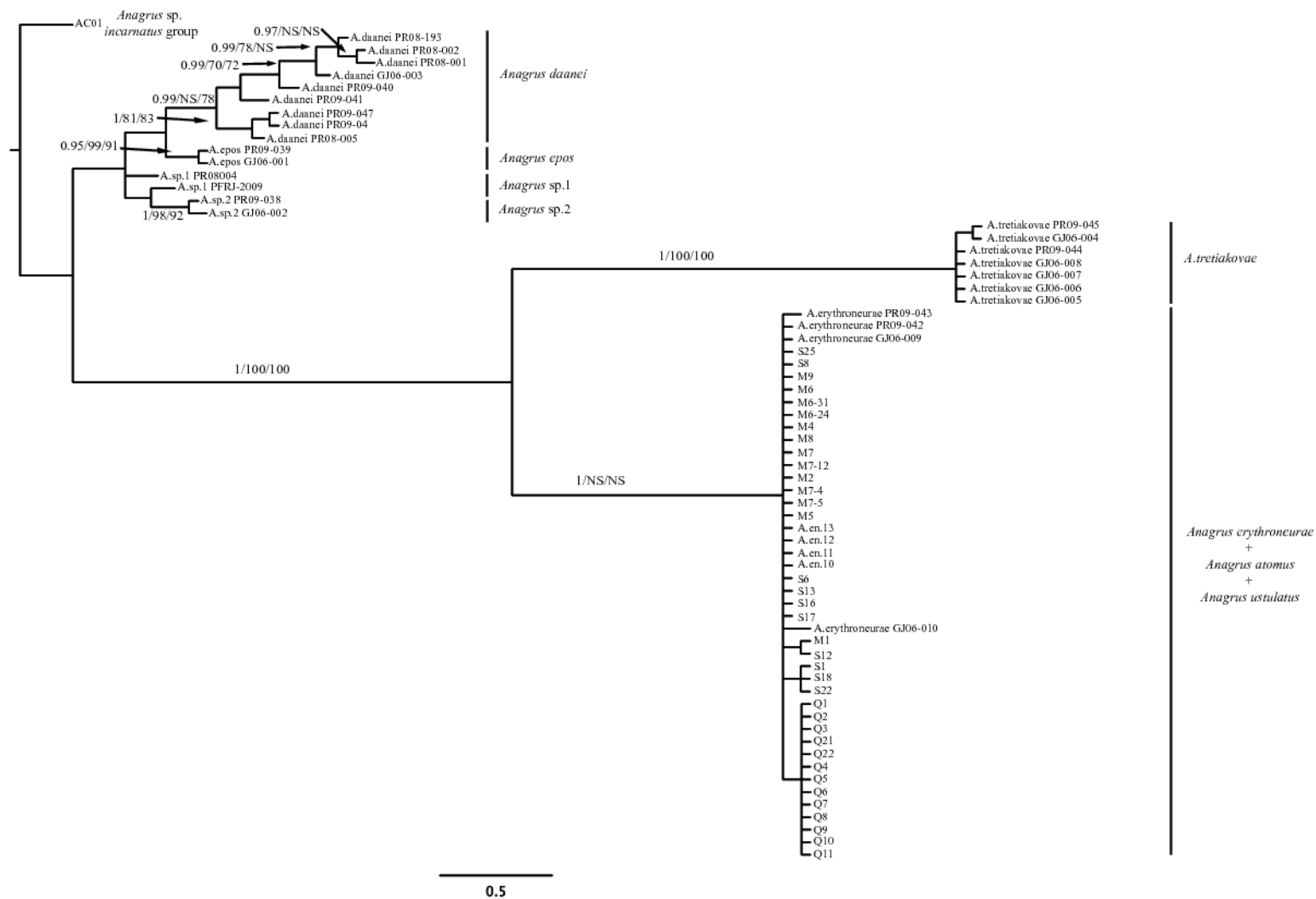


Fig 10. Albero filogenetico ottenuto dalle analisi BI, ML e MP del gene ribosomale 28S-D2 di *Anagrus*.

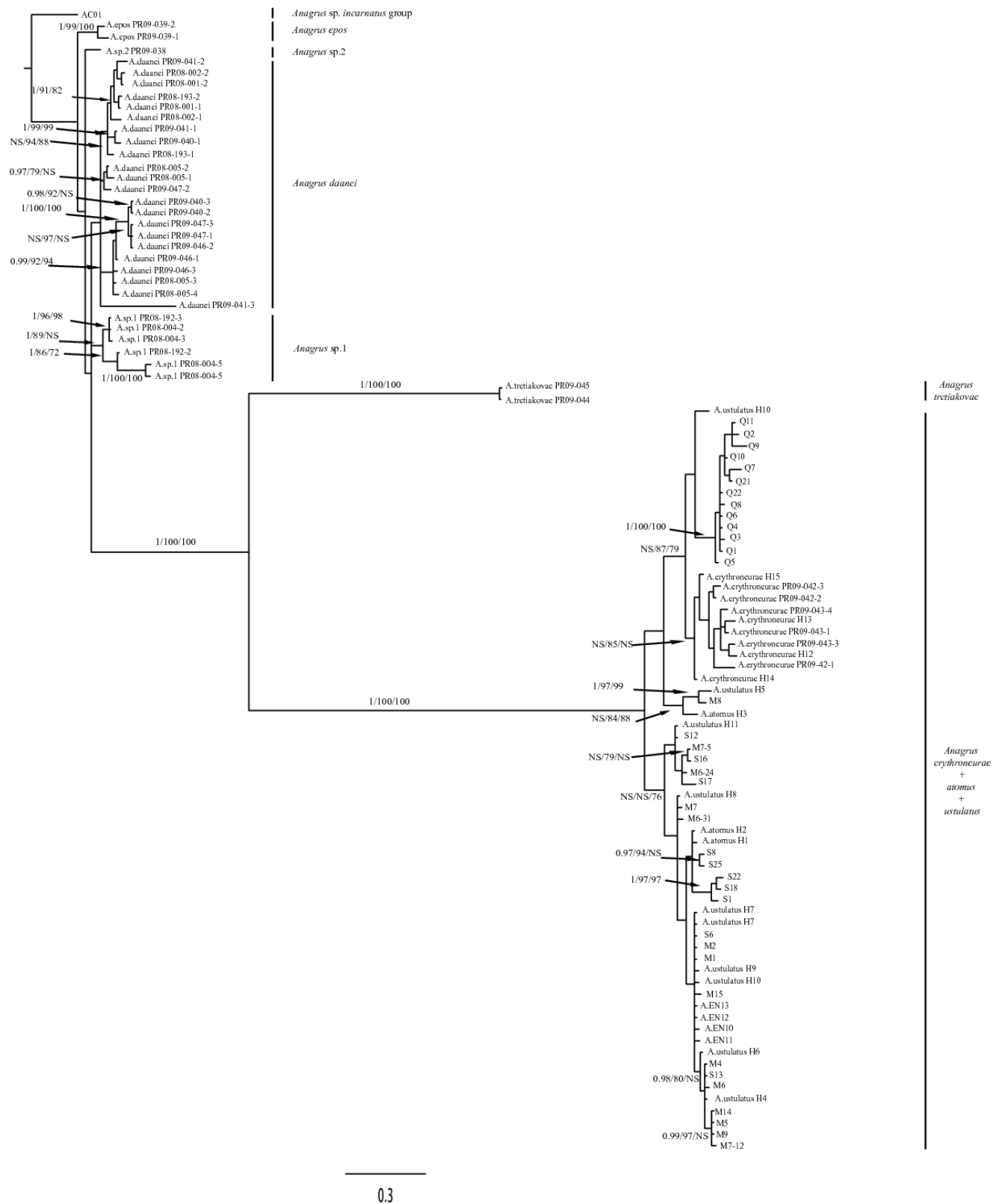


Fig 11. Albero filogenetico ottenuto dalle analisi BI, ML e MP del gene ribosomale ITS2 di *Anagrus*.

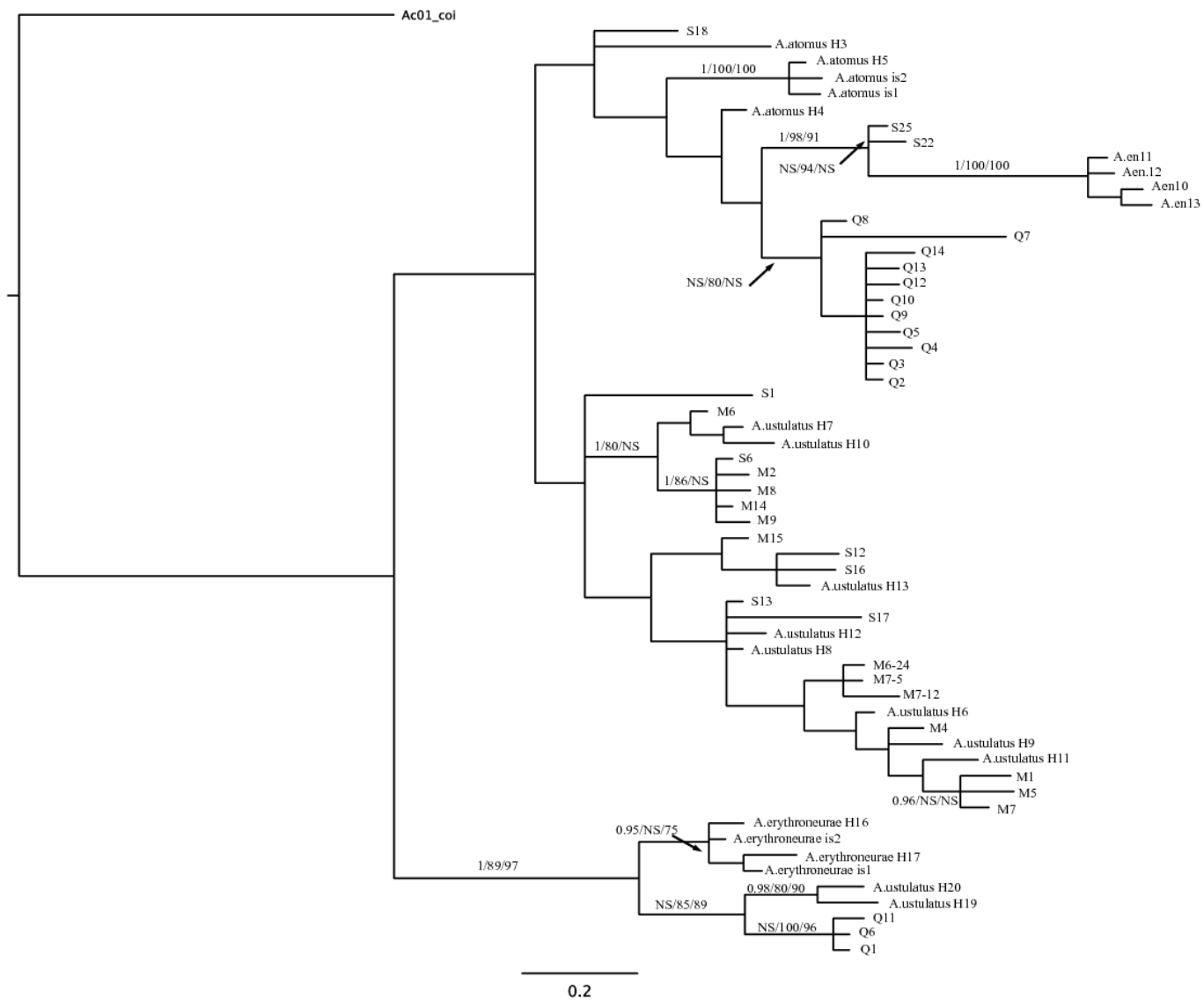


Fig 12. Albero filogenetico ottenuto dalle analisi BI, ML e MP del gene mitocondriale COI di *Anagrus*.

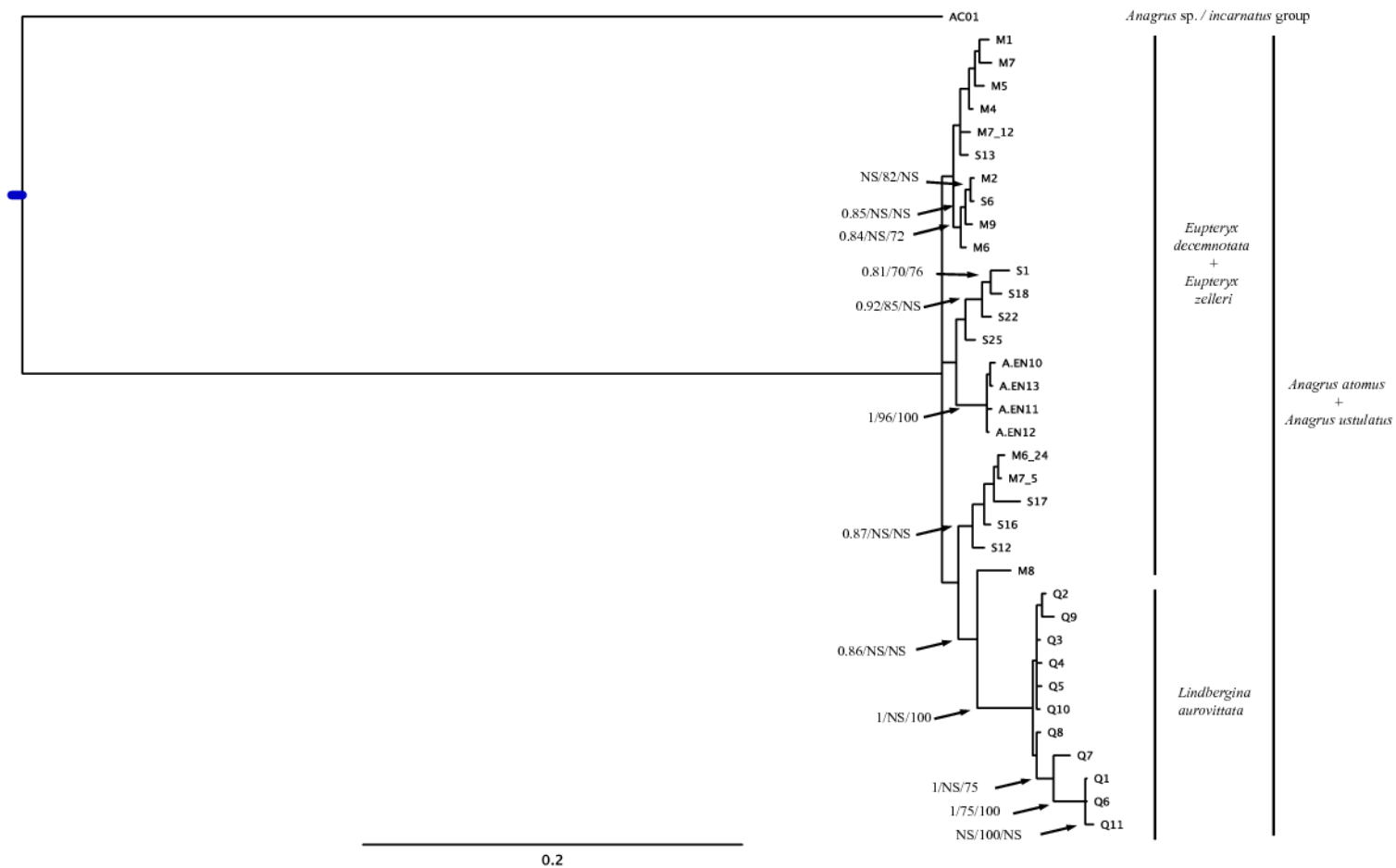


Fig. 13. Albero filogenetico ottenuto dalle analisi BI, ML e MP del data set combinato 28S-D2- ITS2- COI di *Anagrus*.

4.3.3 Network di Parsimonia

L'analisi dei network di parsimonia statistica sui dataset del gene ribosomale 28S-D2 ha prodotto 1 solo network, che include tutti gli individui appartenenti ai gruppi QUE, SAL, MEN e A.EN.

Per la parsimonia statistica della porzione ribosomale ITS2, sono stati ricostruiti 2 network distinti al 95% di confidenza e un limite di parsimonia pari a 11 step mutazionali. Il primo network include tutti gli aplotipi del gruppo QUE, mentre nel secondo network sono interconnessi i gruppi SAL, MEN e A.EN.

Per il frammento di mtDNA l'analisi ha prodotto 4 network al 95% di confidenza, che presentano un massimo di 9 step. Il primo ed il secondo network sono caratterizzati da aplotipi singoli M6-31 e Q7; il terzo network include gli aplotipi Q1-Q6-Q11; il quarto network include tutti i restanti aplotipi del gruppo QUE e MEN con gli aplotipi SAL e A.EN. L'aggiustamento manuale della confidenza al 93 % porta alla formazione di 2 network, che presentano un massimo di 11 step. Il primo network include gli aplotipi Q1-Q11-Q6, mentre il secondo network raggruppa i restanti aplotipi del gruppo QUE e tutti gli aplotipi SAL, MEN ed A.EN.

Infine per il data set combinato al 90% di confidenza sono stati individuati 2 network con un limite di parsimonia di 27 step. Il primo network include tutti gli individui MEN, SAL e A.EN, e il secondo tutti gli individui del gruppo QUE .

4.3.4 Analisi delle Distanze Genetiche

I risultati delle analisi delle distanze genetiche tra i gruppi e all'interno dei gruppi in rapporto al frammento di COI sono riportati in tabella 12. La distanza interspecifica maggiore (3.9%) è risultata tra *A. erythroneurae* ed il gruppo A.EN. mentre la minore (1.5%) tra MEN e SAL. Riguardo alle distanze intraspecifiche, la minore è risultata nel gruppo A.EN. (0.2%) e la maggiore nel gruppo *A. ustulatus* (2%).

Riguardo le distanze interspecifiche ottenute dall'analisi del gene ribosomale ITS2 (Tab. 13), si può notare un massimo (25.3%) tra *A.epos* e QUE. La distanza minima (0.9%) è invece osservabile tra A.EN. e MEN. La distanza intraspecifica minore risulta nel gruppo A.EN. (0.3%) mentre la maggiore negli individui di *A. atomus* (2.6%).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.015							
2	0.022	0.016						
3	0.015	0.023	0.013					
4	0.020	0.028	0.024	0.002				
5	0.019	0.025	0.017	0.029	0.020			
6	0.030	0.026	0.032	0.039	0.028	0.003		
7	0.018	0.021	0.019	0.026	0.022	0.027	0.011	
8	0.068	0.073	0.070	0.073	0.071	0.066	0.073	n/c

Tab. 12. Distanze a coppie di un frammento parziale della COI
1. SAL (*A.atomus*); 2. QUE (*A.ustulatus*); 3. MEN (*A.ustulatus*) 4. A.EN. (*A.atomus*);
5 *A. ustulatus*; 6. *A. erythroneurae*; 7. *A.atomus*; 8. outgroup (gruppo *incarnatus*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.018											
2	0.016	0.013										
3	0.021	0.018	0.026									
4	0.013	0.009	0.014	0.003								
5	0.032	0.032	0.031	0.032	n/c							
6	0.034	0.033	0.032	0.036	0.019	0.009						
7	0.041	0.042	0.040	0.043	0.022	0.030	0.006					
8	0.235	0.231	0.230	0.231	0.234	0.234	0.235	0.000				
9	0.248	0.243	0.244	0.242	0.245	0.245	0.253	0.146	0.008			
10	0.245	0.239	0.240	0.238	0.241	0.242	0.249	0.157	0.031	0.022		
11	0.246	0.241	0.242	0.240	0.242	0.242	0.250	0.159	0.042	0.034	0.020	
12	0.256	0.251	0.253	0.250	0.253	0.252	0.259	0.165	0.063	0.074	0.075	n/c

Tab. 13. Distanze a coppie della porzione ITS2
1. SAL (*A.atomus*); 2. MEN (*A.ustulatus*); 3. *A.atomus*; 4. A.EN. (*A.atomus*); 5 *A. ustulatus*; 6. *A. erythroneurae*;
7. QUE (*A.ustulatus*.); 8. *A. tretiakovae*; 9. *A.epos*; 10. *Anagrus* sp.; 11. *A. daanei*; 12. outgroup (gruppo *incarnatus*).

4.3.5 ISSR-PCR DNA Fingerprinting

L'analisi ha evidenziato per ogni campione impiegato un numero variabile di bande amplificate Fig.13.

Nel gruppo di *Anagrus* QUE, tutti i campioni hanno mostrato un numero omogeneo di bande di simile peso molecolare. Gli individui appartenenti ai gruppi MEN e SAL hanno mostrato un'ampia variazione genetica, pertanto non sono stati identificati marcatori diagnostici fissati.

La tecnica ISSR-PCR risulta utile per discriminare gli individui di *Anagrus* QUE da quelli degli altri due gruppi. Di contro, la variazione osservata in questi ultimi due gruppi impedisce l'utilizzo di tale tecnica come strumento diagnostico.

La tecnica ISSR-PCR è stata utilizzata a scopo diagnostico su popolazioni di *Anagrus* (de León *et al.*, 2008) senza risultati positivi, mentre ha ottenuto successo su popolazioni di *Gonatocerus* (de León *et al.*, 2004, 2006b; de León & Morgan, 2007).

4.4 Studio degli Endosimbionti

4.4.1 Individuazione tramite DGGE

Lo screening dei simbionti effettuato tramite tecnica della DGGE ha evidenziato la presenza del batterio *Wolbachia* negli individui QUE. Dall'immagine (Fig.14) si può notare nei campioni Q1-Q2-Q3-Q4 e Q5, la presenza di amplificati che hanno migrato alla stessa altezza della banda mostrata da *Encarsia formosa* (Gahan), parassitoide infetto da *Wolbachia*. Non hanno invece mostrato bande in corrispondenza di altri batteri endosimbionti *Cardinium* e *Rickettsia*.

Gli *Anagrus* appartenenti agli altri gruppi non hanno mostrato bande in corrispondenza di alcun batterio utilizzato come riferimento in questo studio.

Ulteriori verifiche sono state effettuate, su altri campioni appartenenti ai tre gruppi, utilizzando i primer specifici per i tre batteri citati e hanno dato risultati congruenti con quanto evidenziato tramite la DGGE.

Gli individui A.EN., provenienti da una popolazione telitoca della Biowise, non hanno mostrato presenza di batteri simbiotici.

4.4.2 MLST: Multilocus Sequence Typing System

Dai risultati ottenuti dalla DGGE si è proceduto applicando il protocollo MLST agli *Anagrus* del gruppo QUE al fine di caratterizzare il supergruppo della *Wolbachia* individuata nei campioni.

Dai 5 geni previsti dal protocollo MLST sono stati amplificati e sequenziati 3 geni: *coxA* e *ftsZ* e *fbpA*.

Le sequenze sono state inserite nel sistema *Wolbachia* MLST Databases per determinare l'allele di appartenenza.

Il Gene *coxA* ottenuto, di lunghezza pari a 402 bp, è risultato corrispondente al 100% alla sequenza dell'allele 14 della banca dati MLST.

Il gene *ftsZ* è risultato di 435 bp e la sequenza corrispondente al 100% apparteneva all'allele 7.

Infine il gene *fbpA*, di 429 bp, risultava corrispondente al 99.77% alla sequenza dell'allele 9 dell'MLST, mostrando una sola transizione A>G in posizione #349.

Secondo il *Wolbachia* MLST database le sequenze alleliche riconosciute appartengono al supergruppo B di *Wolbachia*. In particolare tali alleli sono ritrovati nelle sequenze tipo 129 e 176 del suddetto database.

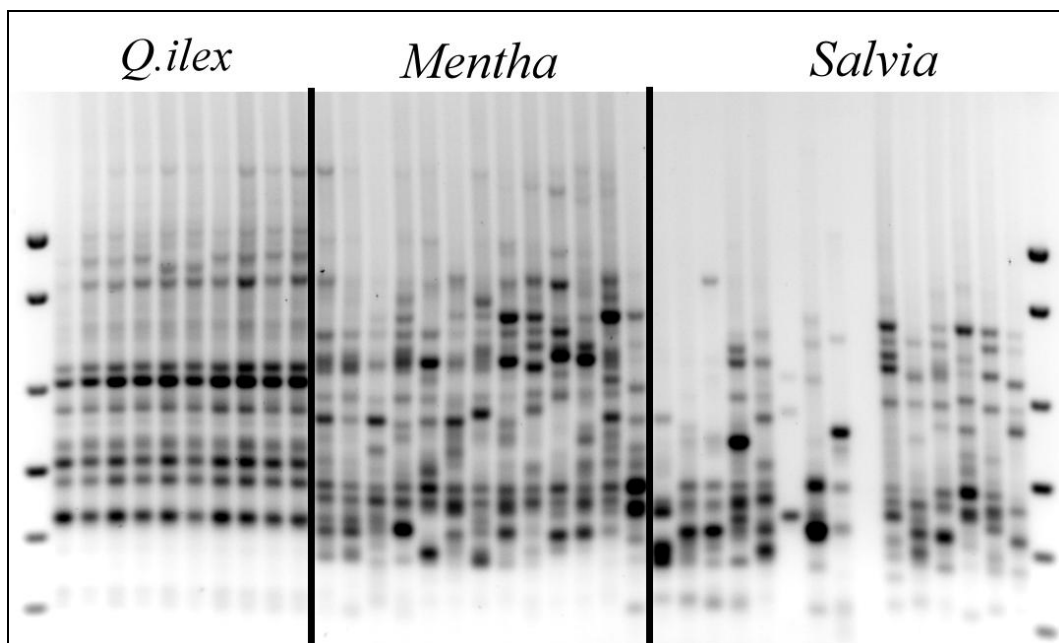


Fig. 13. ISSR-PCR DNA fingerprinting dei 3 gruppi di *Anagrus*.
Marker 1.0 Kb Plus DNA Ladder.

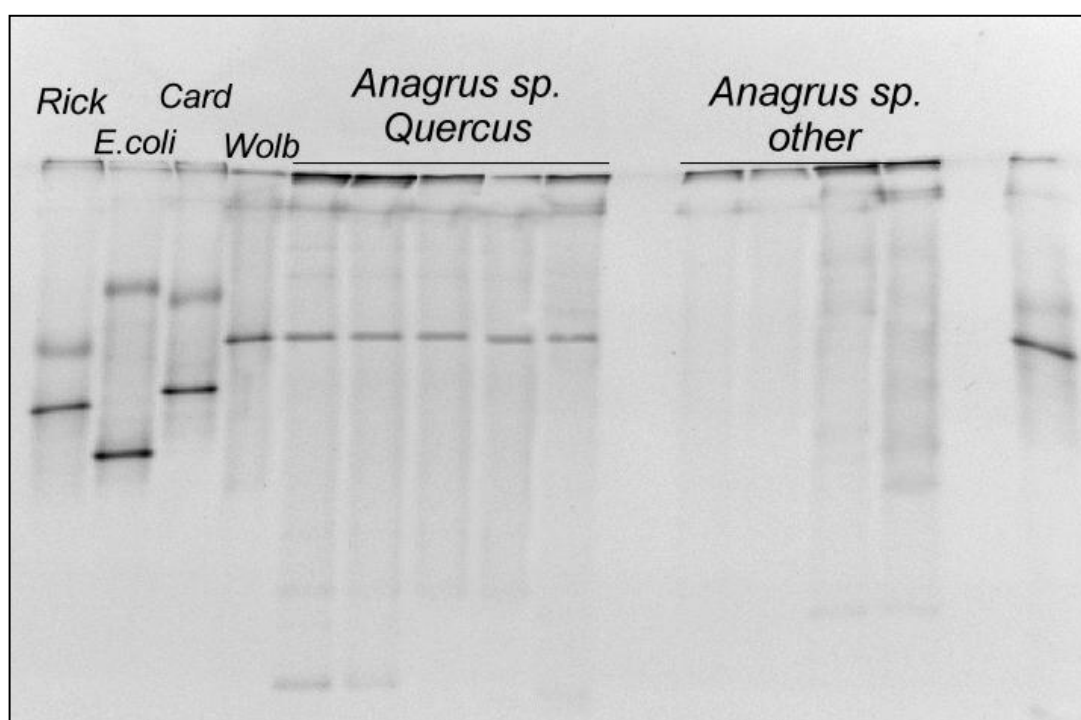


Fig.14. Gel di poliacrilammide per la tecnica DGGE effettuata su alcuni individui di *Anagrus*. Rick: *Rickettsia* da *P. soemius*;
Card: *Cardinium* da *E. meritoria* e Wolb: *Wolbachia* da *E. formosa*

4.5. Analisi Morfometrica

I risultati dell'analisi morfometrica di *Anagrus* QUE (14 ♀), *Anagrus* MEN. (15 ♀) ed *Anagrus* del gruppo SAL. (11 ♀) in merito alle loro lunghezze e rapporti, con relative medie ed intervalli sono presentati nella tabella 15.

L'approccio univariato è risultato utile solo il rapporto tra la lunghezza dell'ovopositore e la lunghezza della protibia (Lo/Lft). Infatti tale rapporto permette di distinguere i campioni del gruppo QUE da quelli dei gruppi MEN e SAL, ma non permette di distinguere questi ultimi due in quanto si verifica un'ampia sovrapposizione dei caratteri discriminanti. Tale sovrapposizione è stata rilevata per i restanti caratteri e rapporti presi in analisi, e pertanto, sulla base di tali misure, non è possibile discriminare nessuna delle tre entità studiate.

L'approccio multivariato (CDA) ha permesso di trovare due funzioni discriminanti, ma una sola tra queste risulta significativa ed ha consentito di classificare correttamente l'85% dei 40 campioni esaminati (Tab. 14 e 16).

Classification table		Predicted specie		
Actual specie	Group size	<i>Q.ilex</i> (<i>A.ustulatus</i>)	<i>Mentha</i> sp. (<i>A. ustulatus</i>)	<i>Salvia</i> sp. (<i>A. atomus</i>)
<i>Q.ilex</i> (<i>A.ustulatus</i>)	14	14 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
<i>Mentha</i> sp. (<i>A. ustulatus</i>)	15	0 (0.00%)	11 (73.33%)	4 (26.67%)
<i>Salvia</i> sp. (<i>A. atomus</i>)	11	0 (0.00%)	2 (18.18%)	9 (81.82%)

Tab. 14. Percentuale dei casi correttamente classificati: 85%

CARATTERE	<i>Anagrus/Q.ilex</i>		<i>Anagrus/Mentha</i> sp.		<i>Anagrus/Salvia</i> sp.	
	Mean±SE	Min-Max	Mean±SE	Min-Max	Mean±SE	Min-Max
SC	69.69±1.41	59.23 – 80.47	89.08±0.89	81.36 - 94.78	87.96±1.59	80.23 - 95.04
Pe	38.59±0.69	32.39 - 42.83	36.67±0.51	32.1 - 39.43	37.04±0.57	34.31 - 40.82
F1	21.15±0.57	18.55 - 24.58	18.77±0.18	17.6 - 19.83	18.92±0.30	17.22 - 20.05
F2	45.88±0.60	41.27 - 49.87	38.83±0.79	32.99 - 43.25	38.41±1.03	32.17 - 42.43
F3	41.29±0.84	32.54 - 45.81	36.60±0.90	28.74 - 41.46	37.69±1.21	31.02 - 44.24
F4	45.74±0.88	39.71 – 52.45	44.22±1.16	36.49 – 52.25	45.42±1.33	36.87 – 53.27
F5	48.39±0.47	44.06 – 50.83	51.25±0.75	45.45 – 54.93	49.71±0.88	45.44 – 55.66
F6	52.91±1.08	39.84 – 56.32	53.71±0.82	48.07 – 58.1	53.42±0.73	50.58 – 56.1
WC	28.03±0.97	21.77 – 34.26	30.19±0.68	25.72 – 33.89	30.43±0.74	26.43 – 34.64
LC	102.26±1.09	92.46 – 108.76	102.64±0.97	94.01 – 106.42	103.34±0.91	99.49 – 109.56
Lfw	547.46±7.8	464.42 – 578.21	474.9±4.82	421.32 – 493.51	476.68±7.33	446.28 – 531.44
Wfw	73.01±2.01	58.09 – 87.24	54.57±0.8	45.33 - 58	56.4±2.48	40.46 – 72.44
Lhw	476.31±7.70	388.27 – 515. 61	427.14±4.53	373.72 – 444.3	433.74±5.80	400.66 – 456.07
LO	186.46±2.57	170.83 – 205.56	229.02±2.88	208.46 – 244.23	226.71±6.49	193.49 – 263.06
Lft	128.41±1.50	123.32 – 140.63	114.08±1.60	98.25 – 121.51	115.89±1.89	100.77 – 125.36
Lmt	169.57±2.60	140.63 – 178.55	159.01±2.11	139.78 – 168.81	158.87±1.84	145.51 – 172.79
Ftot	258.68±4.51	215.97 – 287.29	243.39±4.19	210.95 – 264.17	245.06±3.77	220.77 – 267.47
Flms	227.33±3.74	209.25 – 248.05	177.07±1.49	166.32 – 185.52	182.31±4.39	162.11 – 221.19
RATIOS						
LO/ Lft	1.45±0.02	1.21 – 1.62	2.01±0.03	1.73 – 2.17	1.95±0.04	1.74 – 2.11
LO/Lmt	1.10±0.01	1.02 – 1.21	1.44±0.19	1.24 – 1.57	1.41±0.04	1.19 – 1.63
Lfw/Wfw	7.54±0.13	6.63 – 8.15	8.72±0.09	8.09 – 9.29	8.61±0.39	7.34 – 12.09
Flms/Wfw	3.14±0.08	2.55 – 3.60	3.26±0.06	2.92 – 3.75	3.28±0.12	2.96 – 4.32
Ftot/LC	2.53±0.03	2.34 – 2.73	2.37±0.03	2.19 – 2.53	2.37±0.03	2.21 – 2.50

Tab 15.: Medie, Minime (Min.) e massime (Max.) di 18 caratteri e 5 rapporti di *Anagrus* provenienti da *Q. ilex*, *Mentha* sp. e *Salvia* sp.

Caratteri e rapporti	Coefficienti standardizzati	Coefficienti Non standardizzati
WC	0.507394	0.16996
Lhw	-1.0131	-0.044955
Pe	0.0955554	0.0437562
SC	0.793686	0.16925
Ftot/LC	-0.202434	-1.89266
LO/Lmt	0.179459	2.00703
LO/Lft	0.815415	7.29537
Flms/Wfw	0.53852	-1.77405
Lfw/Wfw	0.087211	1.04557
Costante	-	-14.5933

Tab. 16. Coefficienti standardizzati e non standardizzati della funzione canonica discriminante (eigenvalue = 32.0728 $P < 0.001$) effettuata sui 3 gruppi di *Anagrus* presi in esame sulla base di 4 caratteri e 5 rapporti

In particolare, l'analisi multivariata ha discriminato il 100% dei 14 individui di *Anagrus* del gruppo QUE, il 73.33% e l'81.82 % degli individui rispettivamente del gruppo MEN e SAL. Pertanto, da tali risultati, è facilmente intuibile che è possibile discriminare gli individui da *Q.ilex* da quelli provenienti dalle altre due essenze. Si evince inoltre che è impossibile distinguere tra gli individui MEN e SAL in quanto è emersa una forte sovrapposizione dei caratteri discriminanti le due entità.

Il plot delle funzioni discriminanti mette maggiormente in risalto i risultati ottenuti da tale analisi (Fig. 15).

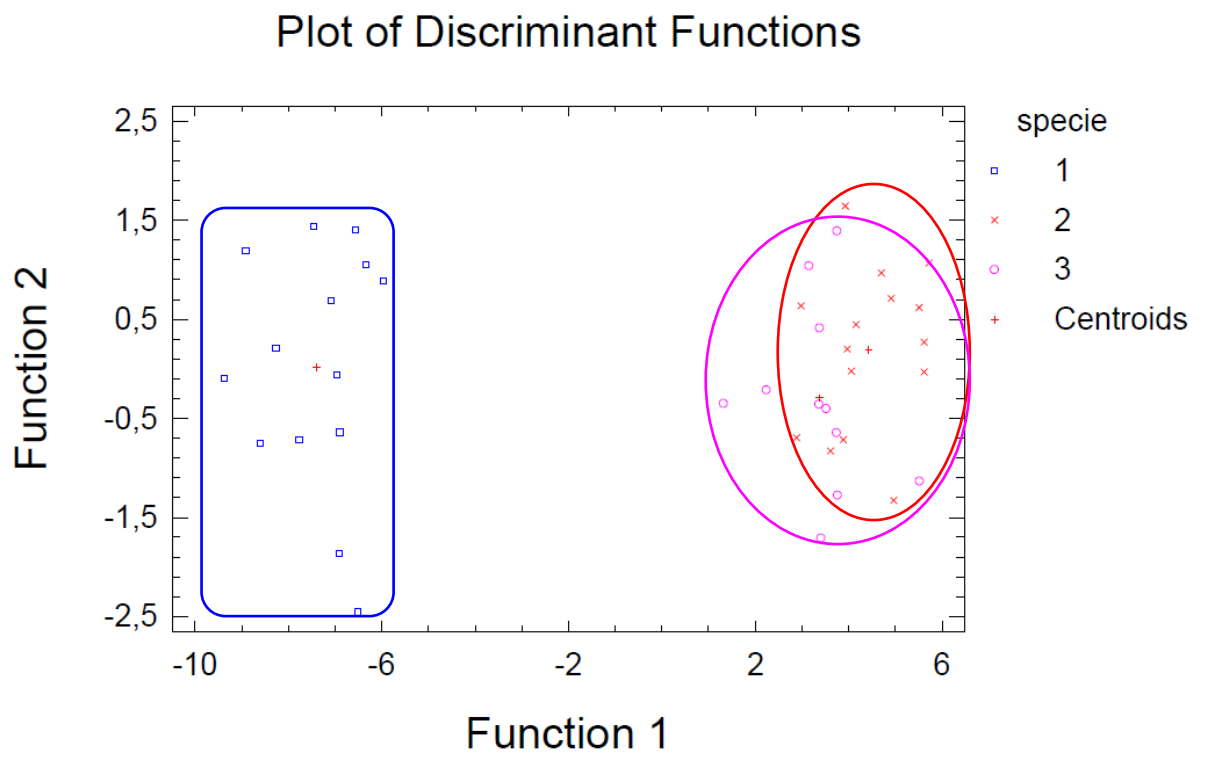


Fig. 15. Plot delle funzioni discriminanti sui tre gruppi di *Anagrus* presi in esame: 1. QUE; 2.MEN; 3.SAL.

5. DISCUSSIONI

Il successo o il fallimento di diversi progetti di controllo biologico contro insetti dannosi dipende in modo principale dalla corretta identificazione tassonomica della specie bersaglio e del suo nemico naturale (Gordh & Beardsley 1999). L'attuale possibilità di utilizzare delle tecniche molecolari per la caratterizzazione delle specie rappresenta un potente strumento d'indagine che però deve essere usato in combinazione con dati di tipo biologico, ecologico e morfologico, secondo un approccio integrato il cui successo è stato più volte documentato negli ultimi anni (Schlick-Steiner *et al.* 2010; Roe & Sperling, 2007; Bernardo *et al.*, 2008).

Nel caso del genere *Anagrus*, le difficoltà maggiori derivano dalla gestione di individui molto piccoli e, per quanto finora noto, almeno per alcune specie, con un ampio host range (Matteucig e Viggiani, 2008). Basti pensare, per esempio, al caso di *A. epos* Girault che per lungo tempo è stata considerata una singola specie ooparassitoide di diverse cicaline della vite nel Nord America, ma in realtà è risultato essere un complesso di almeno cinque differenti specie di cui alcune nuove (Triapitsyn, 1998).

Nel caso specifico degli *Anagrus* del gruppo *atomus*, *A. atomus* e *A. ustulatus*, alle sottili differenze morfologiche utilizzate per la loro discriminazione, non sempre corrisponde una distinzione su base genetica (Monti *et al.*, 2009). Ciò comporta la necessità di acquisire dati biologici, tra i quali quelli di prove di accoppiamento e di progenie, utilizzando materiale proveniente da sistemi pianta-ospite diversi.

I dati raccolti nel presente lavoro per l'*A. atomus* parassitoide di *E. decemnotata* su *Salvia* sp. e l'*A. ustulatus* parassitoide di *E. zelleri* su *Mentha* sp., supportano l'isolamento riproduttivo delle popolazioni saggiate. Non si sono infatti registrati accoppiamenti tra individui di sesso opposto provenienti da sistemi pianta-ospite differenti.

Tuttavia risulta evidente la necessità di estendere l'indagine ad altri sistemi pianta-ospite dai quali si ottengono individui riferibili alle specie

citare. Inoltre, poiché queste due entità possono svilupparsi anche sugli stessi ospiti (Matteucig e Viggiani, 2008), occorrerebbe studiare la variabilità di caratteri morfometrici della progenie ottenuta da singole femmine.

Purtroppo anche per le specie di *Anagrus* più diffuse, come *A. atomus*, iniziano solo ora delle ricerche bio-ecologiche approfondite dalle quali si possono ottenere delle informazioni sulle diverse popolazioni legate a sistemi differenti (Hesami *et al.*, 2009; Zanolli & Pavan, 2011). Il loro studio con approccio integrato può apportare conseguenze significative di ordine generale e applicativo.

Quanto detto vale anche per *A. ustulatus*. Nel presente lavoro infatti, emerge che nell'ambito delle popolazioni riferite a questa entità, si possono probabilmente distinguere delle specie criptiche.

L'approccio integrato di questo lavoro ha previsto l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare ampiamente usate negli studi delle dinamiche di popolazione e in quelli di filogenesi a livello di specie.

Negli ultimi anni la tecnica ISSR si è rivelata efficace per chiarire vari aspetti di genetica di popolazione nei più svariati campi di applicazione (Wolfe *et al.*, 1998; Casu *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2005). Inoltre tali marcatori molecolari hanno avuto successo anche negli studi di popolazioni di Mymaridae, in particolare hanno permesso di discriminare le entità appartenenti al complesso specie di *G. tuberculifemur* dove altri marcatori molecolari (ITS2 e COI), sovente utilizzati, avevano fallito (de León *et al.*, 2008b).

In un recente lavoro volto alla discriminazione di specie di *Anagrus* tramite l'ISSR, la non identificazione di marker specifici non ha permesso di distinguere due popolazioni di *A. ustulatus* provenienti dall'Italia e dalla Nuova Zelanda in quanto le due popolazioni sono associate da un'ampia variabilità genetica (de León *et al.*, 2008).

Nel presente lavoro, invece, i marcatori ISSR si sono rivelati strumenti efficaci nella discriminazione della popolazione di *Anagrus* vincolata alle uova di *L. aurovittata*; in particolare l'ISSR ha evidenziato una bassissima variabilità genetica intraspecifica per tale specie. Al contrario, non si è rivelata utile nella discriminazione degli individui di *A. atomus* e *A. ustulatus* provenienti dai sistemi presi in esame, in quanto si è verificata una eterogeneità nelle bande amplificate tramite ISSR associate quindi ad un'alta variabilità intraspecifica.

Le analisi filogenetiche del gene ribosomale 28S-D2 hanno permesso di distinguere tre cladi, due dei quali già morfologicamente discriminabili in quanto appartenenti a due gruppi-specie differenti: gruppo *atomus* contenente le specie oggetto dello studio e *A. erythroneurae*, differenziato dal gruppo *incarnatus* che a sua volta include il complesso di specie *epos* e l'outgroup AC01. Il terzo clade composto dagli individui di *A. tretiakovae* che, seppure appartenente al gruppo specie *incarnatus*, risulta distante da entrambi i cladi succitati. Tale divergenza era stata già evidenziata da Triapitsyn *et al.* (2010) ed è anche sostenuta da differenze morfologiche tra il complesso “*epos*” e *A. tretiakovae*. Nell'ambito del gruppo *atomus*, tale marcatore non è stato in grado quindi di discriminare alcuna popolazione dalle altre, anche se gli individui appartenenti alla popolazione ex *L. aurovittata* formano un gruppo a parte che però non è statisticamente supportato. Analogamente, l'analisi di parsimonia statistica effettuato sulla 28S-D2 delle specie oggetto di tale studio non ha consentito di discriminare alcuna entità. Tali risultati sono spiegabili considerando che la 28S è un gene ribosomale molto conservato, che però in alcuni casi è risultato utile nella discriminazione di specie affini (Gebiola *et al.*, 2009).

Lo studio della porzione ribosomale ITS2 ha dato risultati paragonabili a quelli ottenuti con la 28S-D2. Infatti si ripropongono i tre cladi principali che distinguono il complesso “*epos*”, l'*A. tretiakovae* e le specie afferenti al gruppo *atomus*. In particolare, per quest'ultimo gruppo l'ITS2 non permette

discriminazioni ben definite. L'unica discriminazione all'interno di tale clade si verifica per la popolazione ex *L. aurovittata* che risulta reciprocamente monofiletica rispetto agli individui di *A. erythroneurae*. Tale marcatore invece non discrimina le altre popolazioni afferenti al gruppo *atomus*. Pertanto il risultato conseguito coincide con quello ottenuto da de León *et al.* (2008) nello studio di specie afferenti al gruppo *atomus*. Inoltre la popolazione ex *L. aurovittata* risulta essere una entità separata dalle altre anche in base alla parsimonia statistica laddove forma un network separato.

Le analisi filogenetiche basate sul gene mitocondriale COI hanno messo principalmente in evidenza le differenze tra *A. atomus*, *A. ustulatus* ed *A. erythroneurae*, confermando quanto affermato da de León *et al.* (2008). In particolare la popolazione ex *L. aurovittata* risulta polifiletica. Tale risultato è stato confermato dalla parsimonia statistica in cui tre campioni (Q1-Q11-Q6) formano un network separato. E' da sottolineare però che gli individui di *A. ustulatus* H20 e H19 sono provenienti dalla Nuova Zelanda e che non è stato possibile distinguerli dagli *A. erythroneurae* (de León *et al.*, 2008; Matteucig, 2008), si potrebbe ipotizzare quindi un errore di identificazione. Anche il gruppo SAL è risultato essere polifiletico .

La distinzione della popolazione ex *L. aurovittata* è stata ulteriormente confermata sia dalle analisi filogenetiche del data set combinato dei 3 geni, sia dalla parsimonia statistica.

La popolazione ex *L. aurovittata* presenta peculiarità biologiche non comuni nel genere *Anagrus*: la popolazione ottenuta è rappresentata quasi esclusivamente da femmine, i maschi sono molto rari. E' molto probabile che la specie si riproduca per partenogenesi telitoca.

In passato sono già state indicate alcune specie di *Anagrus* che si riproducono per partenogenesi telitoca, quali *A. atomus* parassitoide di *E. pallidifrons* (MacGill, 1934) e *A. delicatus* (Croning & Strong, 1996). Inoltre, la cura con rifampicina ha permesso di ipotizzare indirettamente la

presenza dell'endosimbionte *Wolbachia* in una popolazione telitoca di *A. atomus* (Choudhury & Copland, 2003).

Nel presente lavoro, la tecnica DGGE *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* è risultata idonea a monitorare ed identificare i batteri endosimbionti associati alle specie di *Anagrus*. In particolare si è evidenziata la presenza del batterio *Wolbachia* in tutti gli individui del gruppo QUE. Gli *Anagrus* provenienti dalla Biofabbrica BOWISE (A.EN), pur provenendo da una popolazione considerata telitoca, non hanno dato risultati positivi alle PCR diagnostiche per i batteri simbionti. E' quindi probabile che gli studi effettuati sullo stesso materiale da Choudhury & Copland (2003) abbiano comportato un abbassamento, o un totale annullamento, dell'infezione ad opera di *Wolbachia* (comunicazione personale del Dr. Copland).

Le sequenze ottenute dall'amplificazione di tre geni dei 5 previsti dal protocollo *Multilocus Sequence Typing* (MLST), hanno mostrato che la *Wolbachia* presente negli individui QUE risulta simile alle sequenze tipo 129 e 176 afferenti al Supergruppo B. Le sequenze tipo 129 e 176 sono state ritrovate rispettivamente in ditteri Chloropidae e nei lepidotteri Nymphalidae della specie *Hypolimnas bolina* L.. In particolare in *H. bolina*, è stato provato che l'endosimbionte *Wolbachia* è responsabile del male-killing (Mitsunashi *et al.*, 2004). Inoltre i ceppi di *Wolbachia* appartenenti al supergruppo B sono molto diffusi negli imenotteri parassitoidi, tra cui *E. formosa* e *Trichogramma deion* Pinto & Oatman (Baldo *et al.*, 2006), dove inducono la partenogenesi, mentre in *Nasonia vitripennis* (Walker) comportano l'incompatibilità citoplasmatica.

Ulteriori studi saranno utili per completare la caratterizzazione del ceppo di *Wolbachia* presente in *Anagrus*, tramite il sequenziamento del completo set genico previsto dal protocollo MLST. Inoltre resta da dimostrare se il mancato sviluppo dei maschi sia legato all'azione dell'endosimbionte *Wolbachia*. Si dovranno quindi affrontare studi volti alla localizzazione dei

batteri in *Anagrus* utilizzando l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), tentare di ottenere progenie maschile abbassando o annullando l'infezione dell'endosimbionte mediante cure con antibiotici ed alte temperature, già testato da Choudhury & Copland su *A. atomus* (2003), e verificare la funzionalità o meno dei maschi così ottenuti.

Molto singolare è il comportamento biologico della popolazione da *Q. ilex*, che sembra essere fortemente adattato al rapporto *L. aurovittata* - *Q. ilex* e degli altri ospiti invernali a foglie sempreverdi (mirto e rovo). Infatti la cicalina ovidepone nelle uova di ospiti invernali dal tardo autunno e vi svolge una sola generazione che si conclude nella primavera (maggio-giugno), con la comparsa dei nuovi adulti che si riportano sugli ospiti estivi (*Quercus* sp., a foglie caduche, *Castanea* sp., etc.). L'*Anagrus* che si sviluppa nelle uova di *Lindbergina* deposte nelle foglie di *Q. ilex* e altri ospiti invernali sincronizza il rapporto con questi ultimi mediante una lunga diapausa larvale che si estende dalla primavera all'autunno. Conseguentemente, quando la cicalina ospite in autunno si accinge a deporre le uova, l'*Anagrus* rompe la diapausa larvale proseguendo lo sviluppo ad adulto. Tali adulti ovidepongono nelle uova dell'ospite, dando luogo almeno ad una generazione autunno - invernale.

Da inizio primavera, però, le larve intermedie di *Anagrus* presenti nelle uova della cicalina entrano in diapausa. Al contrario del comune comportamento degli *Anagrus* che nel periodo autunno – invernale in mancanza di ospiti alternativi entrano in un periodo di quiescenza allo stato giovanile nelle uova degli ospiti (Williams & Martinson, 2000), per poi riprendere nel periodo primaverile – estivo, la popolazione infeudata a *L. aurovittata* si comporta in modo opposto. Tale comportamento potrebbe essere interpretato come un adattamento del parassitoide al fine di raggiungere la sincronia con lo stadio dell'ospite presente sullo stesso vegetale. Infatti, la cicalina *L. aurovittata*, nel periodo che va da inizio primavera al tardo autunno, non è presente su *Q. ilex*. Una biologia simile

era finora stata rilevata solo da Tsukada (1999) nel sistema *Pieris japonica* – *Stephanitis takeyai* – *Anagrus takeyanus*. In particolare, in questo caso, il parassitoide va incontro ad una diapausa estiva per far fronte alla mancanza del proprio ospite su *P. japonica* e in assenza di *Lyonia ovafolia* var. *elliptica*, ospite alternativo di *S. takeyai*.

La capacità degli *Anagrus* di sincronizzarsi con la biologia degli ospiti è stata rilevata anche in Zanolli & Pavan (2011) da cui è emerso che gli individui di *Anagrus* gruppo *atomus*, infeudati alle cicaline della vite, nel periodo autunnale possono rallentare lo sviluppo al fine di sincronizzare il picco degli sfarfallamenti con le deposizioni delle cicaline che svernano da uovo su rovo.

Infine, l'*Anagrus* ottenuto da uova di *L. aurovittata* su *Q. ilex* può essere morfologicamente distinto dalle altre specie del gruppo *atomus* principalmente per il rapporto lunghezza ovopositore/lunghezza tibia anteriore che è di 1.5-1.6. Nella chiave dicotomica di Chiappini *et al.* (1996) tale specie si colloca accanto a *A. longitibialis* Donev, dalla quale però si distingue per la mancanza di sensilli lineari sugli antennomeri funicolari III e IV.

6. CONCLUSIONI

L'importanza di un approccio integrato per la sistematica del genere *Anagrus* emerge chiaramente dal presente studio, sebbene i differenti metodi utilizzati abbiano mostrato diversi gradi di sensibilità. L'uso della vasta gamma di dati raccolti con vari strumenti d'indagine (molecolari, biologici, morfologici, la presenza degli endosimbionti) fanno intravedere un'ipotesi sulle relazioni specifiche del genere *Anagrus*.

I dati morfometrici, biologici e molecolari mettono in evidenza che *A. ustulatus* vincolato alla cicalina *L. aurovittata* su *Q. ilex* è da ritenere una entità distinta dall'*A. ustulatus sensu* Chiappini (1989) e sarà descritta a breve come nuova specie. D'altro canto, invece, risulta che l'*A. atomus* da *Salvia* sp. e l'*A. ustulatus* da *Mentha* sp., discriminati sinora sulla base della presenza o assenza di un sensillo lineare sul quarto articolo del funicolo antennale, non presentano differenze né morfologiche né genetiche, sulla base dei marcatori molecolari qui usati.

Tuttavia per ottenere una classificazione che possa essere considerata altamente valida è necessario raccogliere un numero maggiore di dati in relazione ai diversi sistemi Pianta - ospite – parassitoide.

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio tutor, il Prof. Antonio P. Garonna, per avermi dato l'opportunità di intraprendere insieme a lui questo percorso contrassegnato da tappe fondamentali per la mia vita.

Inoltre ringrazio il mio cotutor, il Prof. Gennaro Viggiani che, dispensandomi saggi consigli e suggerimenti, mi ha guidato verso la strada giusta da affrontare anche quando tutto sembrava perso.

Mi sentirò sempre in debito con Marco Gebiola per tutti i preziosissimi insegnamenti sugli studi di filogenetica, ma soprattutto per l'estrema pazienza dimostrata nei miei confronti.

Un doveroso ringraziamento va a Umberto Bernardo sia per i suoi fondamentali contributi al lavoro sia per i nuovi spunti di discussione che mi ha offerto.

Vorrei ringraziare anche Maurilia Monti che mi ha avviato e guidato alla scoperta della biologia molecolare e, con Anna Giulia Nappo, ha sempre dato una risposta alle mie solite domande. Ringrazio anche Massimo Giorgini per le tecniche insegnatemi e i suggerimenti sullo studio degli endosimbionti.

Sono in debito con Jesse de León e Marissa Gonzalez per avermi ospitato per cinque mesi nel loro laboratorio USDA, Beneficial Insects Research Unit, Weslaco, Texas, USA e per avermi insegnato ulteriori tecniche molecolari utili alla discriminazione specifica.

Ringrazio inoltre il dottor Mike Copland (WyeBugs) e Sue Cooper (BioWise) per avermi fornito alcuni campioni di *Anagrus*.

Infine sono grato a tutto il personale del Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria e dell' IPP-CNR sezione di Portici per aver contribuito, in un modo o nell'altro, al mio percorso formativo.

8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ADACHI-HAGIMORI T., MIURA K., ABE Y., 2011. Gene flow between sexual and asexual strains of parasitic wasps: a possible case of sympatric speciation caused by a parthenogenesis-inducing bacterium. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 1254-1262.
- AGBOKA K., TOUNOU A. K., AL-MOAALEM R., POEHLING H. M., RAUPACH K., BORGEMEISTER C., 2004. Life-table study of *Anagrus atomus*, an egg parasitoid of the green leafhopper *Empoasca decipiens*, at four different temperatures. *BioControl* 49: 261-275.
- ANNECKE D.P. & DOUTT R.L., 1961. The genera of the Mymaridae. Hymenoptera: Chalcidoidea. *Entomology Memoirs, Department of Agricultural Technical Services, Republic of South Africa* 5:24
- AUSTIN A.D. & DOWTON M., 2000. The Hymenoptera: an introduction. Pag. 3-7 In Austin, A.D. and Dowton M. (eds). *Hymenoptera - Evolution, Biodiversity and Biological Control*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 468 pp.
- BABCOCK C.S. & HERATY J.M., 2000. Molecular markers distinguishing *Encarsia formosa* and *Encarsia luteola* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 738-744.
- BAKKENDORF O., 1925. Recherches sur la Biologie de l'*Anagrus incarnatus* Haliday, *Annales de Biologie Lacustre*, 14: 249-270.
- BALDO L., HOTOPP J.C.D., JOLLEY K.A., BORDENSTEIN S.R., BIBER S.A., CHOUDHURY R.R., HAYASHI C., MAIDEN M.C.J., TETTELIN H., WERREN J.H., 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:7098-7110.
- BERNARDO U., MONTI M.M., NAPPO A.G., GEBIOLA M., RUSSO A., PEDATA P.A., VIGGIANI G., 2008. Species status of two populations of *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae) reared from two different hosts: An integrative approach. *Biological Control*, 46: 293–303.
- BICKFORD D., LOHMAN D.J., SODHI N.S., NG P.K.L., MEIER R., WINKLER K., INGRAM K.K., DAS I., 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 148-155.
- CALENDINI F. & MARTIN J.-F., 2005. PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for Paup* Dos software.

- CAMPBELL B.C., STEFFEN-CAMPBELL J.D., WERREN J.H., 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 2: 225-237.
- CAMPBELL B.C., HERATY J.-Y., RASPLUS K. CHAN, STEFFEN-CAMPBELL J.D., BABCOCK C., 2000. Molecular systematics of the Chalcidoidea, using 28S-D2 rDNA. 59-73 In: Austin, A.D. and M. Dowton (eds). *Hymenoptera - Evolution, Biodiversity and Biological Control*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 468 pp.
- CARGNUS E. & PAVAN F., 2007. Potenzialità dell'elettroforesi enzimatica nello studio tassonomico di *Anagrus* gruppo *atomus* (Hymenoptera: Mymaridae) in agroecosistemi campani. *XXI CNIE*, Campobasso, 11-16 Giugno 2007.
- CASTELLOE J. & TEMPLETON A.R., 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 102-113.
- CASU M., MALTAGLIATI F., COSSU P., LAI T., CURINI-GALLETTI M., CASTELLI A., COMMITO J.A., 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 325: 46-54.
- CHIAPPINI E. & HUBER J.T., 2008. In Capinera, John L. (Ed.) *Encyclopedia of entomology* 2nd ed., 2008, LXIII, 4346 p.
- CHIAPPINI E. & MAZZONI E., 2000. Differing morphology and ultrastructure of the male copulatory apparatus in species-groups of *Anagrus* Haliday (Hymenoptera: Mymaridae). *J. Nat. Hist.* 34: 1661-1676.
- CHIAPPINI E., TRIAPITSYN S.V., DONEV A., 1996. Key to the Holarctic species of *Anagrus* Haliday (Hymenoptera: Mymaridae) with a review of the Nearctic and Palaearctic (other than European) species and descriptions of new taxa. *J. Nat. Hist.* 30:551-595
- CHIAPPINI E., 1989. Review of the European species of the genus *Anagrus* Haliday (Hymenoptera Chalcidoidea), *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, Serie II, 21: 85-119.
- CHOUDHURY D.A.M. & COPLAND M.J.W., 2003. A new record in thelytoky in the egg parasitoid *Anagrus atomus* (Linnaeus) (Hymenoptera: Mymaridae). *Pakistan Journal of Biological Science*, 6 (5): 500-504.
- CLEMENT M., POSADA D., CRANDALL K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1659.

- CRONIN J.T. & STRONG D.R., 1996. Genetic of ovoposition success of a thelytokous fairyflay parasitoid, *Anagrus delicatus*. *Heredity*, 76: 43-54.
- DAR A.S., KUENEN J.G., MUYZER G., 2005. Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Approach To Determine the Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in Complex Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. May 2005: 2325–2330.
- DEBAUCHE H. R., 1948. Étude sur les Mymarommidae et les Mymaridae de la Belgique (Hymenoptera-Chalcidoidea). *Mem. Mus. His. Nat. Belg.*, 108: 1-248.
- DE LEÓN J. H., TRIAPITSYN S. V., MATTEUCIG G., VIGGIANI G., 2008. Molecular and morphometric analyses of *Anagrus erythroneurae* Trjapitzin et Chiappini and *Anagrus ustulatus* Haliday (Hymenoptera: Mymaridae). *Boll. lab. Ent. agr. Filippo Silvestri*, 62:19-32.
- DE LEÓN J. H., LOGARZO G. A., TRIAPITSYN, S. V. 2008b. Molecular characterization of *Gonatocerus tuberculifemur* (Ogloblin) (Hymenoptera: Mymaridae), a prospective *Homalodisca vitripennis* (Germar) (Homoptera: Cicadellidae) biological control candidate agent from South America: Divergent clades. *Bull. Entomol. Res.*, 98: 97–108
- DE LEÓN J. H. & MORGAN D. J. W. 2007. Evaluation of molecular markers for discriminating *Gonatocerus morrilli* (Hymenoptera: Mymaridae): A biological control agent for *Homalodisca vitripennis*. *Ann. Entomol. Soc. America*, 100 (5): 749-757.
- DE LEÓN J. H., JONES W. A., SÉTAMOU M., MORGAN D. J. W. 2006. Genetic and hybridization evidence confirms that a geographic population of *Gonatocerus morrilli* (Hymenoptera: Mymaridae) from California is a new species: Egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulate* (Homoptera: Cicadellidae). *Biol. Control*, 38 (2): 282-293.
- DE LEÓN J. H., JONES W. A., MORGAN D. J. W. 2004. Molecular distinction between populations of *Gonatocerus morrilli*, egg parasitoids of the glassy-winged sharpshooter *Homalodisca coagulata*, from Texas and California: Do cryptic species exist? *J. Insect Sci.*, 4:39: 7 pp.
- DOZIER H.L., 1936. Several undescribed mymarid egg-parasites of the genus *Anagrus* Haliday. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 9(2):177
- ERCOLINI D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 297-314.

- FLOREANI C., PAVAN F., NAZZI F., 2006. Analysis of cuticular hydrocarbons in two *Anagrus* species (Hymenoptera: Mymaridae) as a tool to improve their correct identification. *The Canadian Entomologist*, 138(3): 348-356.
- GANIN M., 1869. Beiträge zur Erkenntniss der Entwicklungsgeschichte bei den Insecten. *Z.wiss.Zool.*, 19: 381-451
- GEBIOLA M., 2008. Morpho-bio-molecular characterization of species of the genus *Pnigalio* Schrank (Hymenoptera: Eulophidae). *Tesi di dottorato*, Università Federico II di Napoli. <http://www.fedoa.unina.it/3070/>
- GEBIOLA M., BERNARDO U., MONTI M. M., NAVONE P., VIGGIANI G., 2009. *Pnigalio agraules* (Walker) and *Pnigalio mediterraneus* Ferrière and Delucchi (Hymenoptera: Eulophidae): two closely related valid species. *Journal of Natural History*, 43: 2465-2480.
- GIBSON G.A.P., 1986. Evidence for monophyly and relationships of Chalcidoidea, Mymaridae and Mymarommatidae (Hymenoptera: Terebrantes). *Canadian Entomologist* 118: 205–240
- GIBSON G.A.P., HERATY J. M., WOOLLEY J. B., 1999. Phylogenetics and classification of Chalcidoidea and Mymarommatoida a review of current concepts (Hymenoptra, Apocrita). *Zoologica Scripta*, 28: 87-124.
- GILLESPIE J.J., MUNRO J.B., HERATY J.M., YODER M.J., OWEN A.K., CARMICHAEL A.E., 2005. A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 for chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1593-1608.
- GORDH G. & BEARDSLEY J.W., 1999. Taxonomy and biological control. In: Bellows, T.S. Jr., Fisher, T.W. (Eds.), *Handbook of Biological Control*. Academic Press, San Diego, pp. 45-46.
- GRAHAM M. W. R. DE V., 1982. The Haliday collection of Mymaridae (Insecta, Hymenoptera, Chalcidoidea) with taxonomic notes on some material in other collections, *Proceedings of the Royal Irish Academy, B* 82 (12), 189-243.
- GRISSELL E.E. & SCHAUFF M.E., 1997. Chalcidoidea. In: Gibson, G.A.P., Huber J.T., Woolley J.B., (Eds.), *Annotated keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. NRC Series. NRC Research Press, National Research Council of Canada. p. 327-427. ISBN 9780660166698.
- GUPTA M., CHYI Y.S., ROMERO-SEVERSON J., OWEN J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006

- HALIDAY A. H., 1833. An essay of the classification of the parasitic Hymenoptera of Britain, which correspond with the *Ichneumones minuti* of Linneaus, *Entomological Magazine*, London, 1: 333-350.
- HALL T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.*, 41:95–98.
- HART M.W. & SUNDAY J., 2007. Things fall apart: biological species form unconnected parsimony networks. *Biology Letters*, 3: 509–512.
- HEBERT P.D.N., PENTON E.H., BURNS J.M., JANZEN D.H., HALLWACHS W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 101: 14812-14817.
- HEBERT P.D.N., CYWINSKA A., BALL S.L., DEWAARD J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 313-321.
- HERATY J., 2004. Molecular systematics, Chalcidoidea, and biological control. In: Ehler L.E., Sforza R., Mateille T. (Eds.), *Genetics, Evolution and Biological Control*. CAB International, Wallingford, pp. 39-71.
- HESAMI S., SEYEDOLESLAMI H., EBADI R., 2004. Biology of *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the grape leafhopper *Arboridia kermanshah* (Homoptera: Cicadellidae). *Entomological Science* 7: 271-276.
- HESAMI S., SEYEDOLESLAMI H., HATAMI B., 2009. Impact of overwintering refugia of *Anagrus atomus* (Hym.: Mymaridae) on egg parasitism of grape leafhopper *Arboridia kermanshah* (Hem.: Cicadellidae). *Plant Protection Journal*, 1(1) :94- 106
- HILLIS D.M. & BULL J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192.
- HUBER J.T., 1986. Systematics, biology, and hosts of the Mymaridae and Mymarommatidae (Insecta: Hymenoptera): 1758-1984. *Entomography* 4: 185-243.
- HUBER J.T. 1997. "Chapter 14. Mymaridae". In Gibson, G.A.P., Huber J.T., Woolley J.B. (Eds.) *Annotated keys to the genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. NRC Series. NRC Research Press, National Research Council of Canada. p. 499–500. ISBN 9780660166698.

- HUBER J.T. 2001. The basal lineages of Mymaridae (Hymenoptera) and description of a new genus, *Borneomymar*. Pp 44-53 in *Parasitic Wasps: Evolution, Systematics, Biodiversity and Biological Control*. Melika G., Thurøczy C.(Eds). Budapest, Agroinform, Kiadó & Nyomba Kft. 480 pp.
- HUELSENBECK, J.P. & RANNALA, B. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under complex and simple substitution models. *Systematic Biology* 53: 904-913.
- HUELSENBECK J.P., RONQUIST F., NIELSEN R., BOLLBACK J.P., 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294: 2310-2314.
- JESU R., 2002. Definition of preimaginal stages of *Anagrus brocheri* Schulz (Hymenoptera: Chalcidoidea: Mymaridae). *Boll. Lab. Ent. Agr. Filippo Silvestri*, 57(2001): 75-80
- JIANG S.T., HONG G.Y., YU M., LI M., YANG Y., LIU Y.Q., WEI Z. J., 2009. Characterization of the complete mitochondrial genome of the giant silkworm moth, *Eriogyna pyretorum* (Lepidoptera: Saturniidae) *Int. J. Biol Sci.*, 5: 351-365.
- KANKARE M., VAN NOUHUYS S., HANSKI I., 2005. Genetic divergence among hostspecific cryptic species in *Cotesia melitaearum* aggregate (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of checkerspot butterflies. *Annals of the Entomological Society of America* 98: 382-394.
- KATOH K. & TOH H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefing in Bioinformatics*, 9: 286-298.
- LAI T., CASU M., VALDESALICI S.,CASTELLI A.,MALTAGLIATI F., 2005. Gli iSSR (Inter Simple Sequence Repeats) come strumento molecolare per l'identificazione tassonomica di ciprinodontiformi mediterranei. *XV Congresso della Società Italiana di Ecologia* – Torino <http://www.xvcongresso.societaitalianaecologia.org/articles/>
- LINNAEUS C., 1767. *Systema Naturae, Editio duodecima reformata*, 1 (2). Holmiae, 940-941.
- MACGILL E.I, 1934. On the biology of *Anagrus atomus* (L.): an egg parasite of the leaf-hopper *Erythroneura pallidifrons* Edwards. *Parasitology*, 26:57-63.
- MATTEUCIG G, 2008 Caratterizzazione biologico-molecolare di popolazioni di *Anagrus* gruppo *atomus* Linnaeus (Hymenoptera: Mymaridae). *Tesi di dottorato*, Università Federico II di Napoli. <http://www.fedoa.unina.it/2532/>

- MATTEUCIG G. & VIGGIANI G., 2008. Fenologia e ospiti di *Anagrus* gruppo *atomus* (Linnaeus) (Hymenoptera: Mymaridae) in Campania. *Boll. lab. Ent. agr. Filippo Silvestri*, 62: 45-50
- MITSUHASHI W, FUKUDA H, NICHIO K, MURAKAMI R., 2004. Male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Hypolimnys bolina*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 112: 57-64.
- MOCKFORD, E.L., 1997. A new species of *Dicomorpha* (Hymenoptera: Mymaridae) with diminutive, apterous males. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90:115-120.
- MONTI, M.M., NAPPO, A.G., GIORGINI, M. 2005. Molecular characterization of closely related species in the parasitic genus *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Bulletin of Entomological Research*, 95: 401-408.
- MONTI M.M., NAPPO A.G., MATTEUCIG G., VIGGIANI G., 2009. Uso di tecniche molecolari per la caratterizzazione di *Anagrus* gruppo *atomus* Linnaeus (Hymenoptera: Mymaridae). *Proc. XXII CNIE* p. 330
- MORATORIO M. & CHIAPPINI E., 1995. Biology of *Anagrus incarnatosimilis* and *Anagrus breviphragma* (Hymenoptera: Mymaridae). *Bollettino Zoologia Agraria Bachicoltura, Serie II*, 27:143–162.
- MOUNT D. W., 2004. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, 2nd ed.. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 692 pp.
- MUNRO J.B., HERATY J.M., BURKS R.A., HAWKS D., MOTTERN J., CRUAUD A., RASPLUS J.Y., JANSTA P., 2011. A molecular phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS ONE* 6(11): e27023. doi:10.1371/journal.pone.0027023
- MUYZER G., DE WAAL E.C., UITTERLINDEN A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59: 695-700.
- MUYZER G., BRINKOFF T., NUBEL U., SANTEGOEDS C., SCHAFER H., WEVER C., 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D., Bruijn F.J. (Eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 3.4.4. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1–27.
- MUYZER G. & SMALLA K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

- MYERS R.M., FISCHER S.G., LERMAN L.S. MANIATIS T., 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13: 3131-3145.
- NEI M. & KUMAR S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 pp.
- NOYES J.S. 2011. Universal Chalcidoidea Database website. www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/index.html.
- NOYES J.S. & VALENTINE E.W., 1989. "Mymaridae (Insecta: Hymenoptera) - introduction, and review of genera". *Fauna of New Zealand* (DSIR Publishing) (No. 17).
- PAGE D.M. & HOLMES E.C., 2001. Molecular evolution - A phylogenetic approach. *Blackwell Science*, USA, 346 pp.
- PINTO J.D., PLATNER G.R., STOUTHAMER R., 2003. The systematics of the *Trichogramma minutum* species complex (Hymenoptera: Trichogrammatidae), a group of important North American biological control agents: the evidence from reproductive compatibility and allozymes. *Biological Control*, 27: 167-180.
- PORTER C. H. & COLLINS F. H., 1991. Species-diagnostic difference in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *American J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 271-279.
- POSADA D., 2008. jModeltest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.
- POSADA D. & CRANDALL K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16 (1): 37-45
- ROE A.D. & SPERLING F.A.H., 2007. Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: An integrative approach. *Molecular Ecology*, 16: 3617-3633.
- RONQUIST F. & HUELSENBECK J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574
- SAHAD K. A., 1984. Biology of *Anagrus optabilis* (Hymenoptera: Mymaridae) an egg parasitoid of delphacid planthoppers. *Esakia* 22: 129-144.
- SAHAD K.A. & HIRASHIMA Y., 1984. Taxonomic studies on the genera *Gonatocerus* Nees and *Anagrus* Haliday of Japan and adjacent regions, with

- notes on their biology (Hymenoptera, Mymaridae). *Bulletin of the Institute of Tropical Agriculture, Kyushu University* 7:1-78
- SANTOLAMAZZA S., BAQUERO S., CORDERO-RIVERA A., 2011. Incidence of *Anagrus obscurus* (Hymenoptera: Mymaridae) egg parasitism on *Calopteryx haemorrhoidalis* and *Platycnemis pennipes* (Odonata: Calopterygidae: Platycnemididae) in Italy. *Entomological Science* 14: 366-369
- SCHAUFF M.E., 1984. The Holarctic genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 12:1-67.
- SCHLICK-STEINER B.C., STEINER F.M., SEIFERT B., STAUFFER C., CHRISTIAN E., CROZIER R.H., 2010. Integrative Taxonomy: a multi-source approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421-438.
- SCHMIDT S. & POLASZEK A., 2007. *Encarsia* or *Encarsiella*? – redefining generic limits based on morphological and molecular evidence (Hymenoptera, Aphelinidae). *Systematic Entomology* 32: 81-94.
- SCHULMEISTER S., 2003. Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 245–275.
- SHEFFIELD V.C., COX D.R., LERMAN L.S. E MYERS R. M., 1989. Attachment of a 40 base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes. *Proc. Natl. Acad. Set, USA* 86: 232-236.
- SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A.T., CRESPI B., LIU H., FLOOK P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.
- STAMATAKIS A., 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.
- STATGRAPHICS PLUS version 3.0. 1997. Manugistics. Maryland USA.
- STOUTHAMER R., BREEUWER J. A. J., LUCK R. F., WERREN J. H., 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 61: 66-68.
- STOUTHAMER R. & KAZMER D.J., 1994. Cytogenetic of microbe associated parthenogenesis, consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73: 317-327.

- STOUTHAMER R., BREEUWER J. A. J., HURST G. D., 1999a. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53:71-102.
- STOUTHAMER R., HU J.G., VAN KAN F., PLATNER G.R., PINTO J.D., 1999b. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *Biocontrol*, 43: 421–440.
- SWOFFORD D.L., 2002. *PAUP**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.*, 24:1596-1599
- TRIAPITSYN S.V., 1998. *Anagrus* (Hymenoptera: Mymaridae) egg parasitoids of *Erythroneura* spp. and other leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) in North America vineyards and orchards: a taxonomic review. *Trans. Am. Entomol. Soc.*, 124:77-112.
- TRIAPITSYN S.V., 2002. Descriptive notes on a new and other little known species of *Anagrus* Haliday, 1833 (Hymenoptera: Mymaridae) from the New World tropics and subtropics. *Entomotropica Boletín de Entomología Venezolana*, 17(3): 213-223.
- TRIAPITSYN S.V., RUGMAN-JONES P.F., JEONG G., MORSE J.G., STOUTHAMER R., 2010. Morphological and molecular differentiation of the *Anagrus epos* species complex (Hymenoptera: Mymaridae), egg parasitoids of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) in North America. *Zootaxa*, 2428: 1-21.
- TSUKADA M., 1999. Interpopulation variation of hibernation-aestival-diapause in the egg parasitoid wasp *Anagrus takeyanus*: adaptation to seasonal host-plant alternation of the tingid host, *Stephanitis takeyai*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92: 37-43.
- VIDANO C., BOSCO D., ARZONE A., 1990. Dioecia obbligatoria in *Lindbergina* (Homoptera: Auchenorrhyncha Cicadellidae). *Redia*, 78 (2): 293-306.
- VIGGIANI G., SASSO R., DI LUCA A., 2004. Notizie preliminari sulle cicaline del rovo (Homoptera: Cicadellidae: Typhlocybae) e sui loro ooparassitoidi nell'Italia Meridionale. *Boll. Lab. Ent. Agr. Filippo Silvestri*, 59: 33-47.
- VIGGIANI G., SASSO R., BERNARDO U., 2003. Notizie preliminari sullo svernamento di *Anagrus ustulatus* Haliday (Hymenoptera: Mymaridae), ooparassitoide di cicaline (Homoptera: Cicadellidae) nel sud Italia. *Boll. Lab. entomol. agr. Filippo Silvestri*, 58 (2002): 127-136.

- VIGGIANI G., 1989. A preliminary classificazione of the Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea) based on the external male genitalic characters. *Boll. lab. Ent. agr. Filippo Silvestri*, 45(1988): 141-148
- VIGGIANI G., 1970. Sul valore tassonomico dell'organo copulatore nei mimaridi del genere *Anagrus* Hal. ricerche sugli Hymenoptera Chalcidoidea. XXIV. *Boll. lab. Ent. agr. Filippo Silvestri*, 28: 10-18.
- WALSH P.A., METZGER D.A., HIGUCHI R., 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.
- WEISBURG W. G., BARNS S. M., PELLETIER D. A., LANE D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
- WERREN J. H., 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587-609.
- WERREN J. H., WINDSOR D. M., GUO L. R., 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 262:197-204.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., TINGLEY S.B., 1990. Dna polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535
- WILLIAMS L. III & MARTINSON T. E., 2000. Colonization of New York vineyards by *Anagrus* spp. (Hymenoptera: Mymaridae): overwintering biology, within-vineyard distribution of wasps, and parasitism of grape leafhopper, *Erythroneura* spp. (Homoptera: Cicadellidae), eggs. *Biological Control*, 18: 136-146.
- WOLFE A.D., XIANG Q.Y., KEPHART S.R., 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular Ecology*, 7: 1107-1125
- YOSHIMOTO C.M.; KOZLOV M.A.; TRJAPITZIN V.A. 1972: A new subfamily of Mymaridae (Hymenoptera, Chalcidoidea) [in Russian]. *Entomologicheskogo Obozrenie* 51: 878-885. [English translation: *Entomological review (Washington)* 51: 521-525.
- ZANOLLI P. & PAVAN F., 2011. Autumnal emergence of *Anagrus* wasps, egg parasitoids of *Empoasca vitis*, from grapevine leaves and their migration towards brambles. *Agricultural and Forest Entomology*, 13: 423-433
- ZCHORI-FEIN E., ROUSH R.T., HUNTER MS., 1992. Male production by antibiotic treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), in asexual species. *Experientia*, 48:173-78

ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D., 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. – *Genomics*, 20 (2): 176-183.